



**ANA SOFIA RAMOS
TAVARES**

**HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA DO SANGUE DE
ANIMAIS MARINHOS EM RECUPERAÇÃO NO
CRAM-ECOMARE**

Declaração

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2018

**ANA SOFIA RAMOS
TAVARES**

HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA DO SANGUE DE ANIMAIS MARINHOS EM RECUPERAÇÃO NO CRAM- ECOMARE

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica da Doutora Catarina Eira, equiparada a Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio do CPRAM e CRAM-ECOMARE,
Universidade de Aveiro

Projecto LIFE+ MarPro
(NAT/Pt/00038) cofinanciado pela
Comissão Europeia .

Apoio da Sociedade Portuguesa de Vida
Selvagem



À família e a todos os que acreditam e me dão asas para voar.

O júri

Presidente

Doutora Ana Isabel Lillebø Batista
Investigadora Principal em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

Vogais

Doutor Pedro Correia Rodrigues
Professor Adjunto Convidado, Instituto Politécnico do Porto – Escola Superior de
Educação (Arguente Principal)

Doutora Catarina Isabel da Costa Simões Eira
Equiparada a Investigadora Auxiliar, Universidade de Aveiro (Orientadora)

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente ao CRAM – ECOMARE e à Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem por me terem dado a oportunidade de aprender e trabalhar num meio que eu tanto adoro.

À minha orientadora, Catarina Eira, por todo o tempo disponibilizado, por todas as opiniões, ajuda, trocas de ideias e por me ter dado a oportunidade de trabalhar nesta temática que contribuiu imenso para o aumento da minha formação e que certamente será uma mais valia para a minha vida futura.

Ao Professor José Vingada pela oportunidade e por toda a ajuda dada.

À Marisa Ferreira por todas as ferramentas disponibilizadas e todo o tempo dispensado para me explicar e ajudar a idealizar este trabalho.

Às meninas dos turnos, Ema e Fabiana, por todos os ensinamentos relativos à reabilitação, conversas, opiniões e ajuda na parte prática deste trabalho.

Ao restante pessoal do CRAM desde voluntários a estagiários, pelo convívio e troca de ideias.

Aos meus pais, um grande obrigado, por permitirem que tudo isto se realizasse e à minha irmã pela toda a ajuda dada.

A ti, Ricardo Gomes, por me teres acompanhado nesta longa jornada tão importante para o meu percurso académico, pela compreensão, preocupação e por estares sempre presente em todos os momentos.

Vera e Sandra, um sincero obrigado pela amizade, pela força, críticas e conselhos que tão importante foram ao longo deste percurso.

A todos os meus amigos que participam diariamente na minha vida, obrigada por todos os conselhos, ajuda e motivação para que tudo corresse da melhor forma possível.

A toda a minha família "não humana" pela companhia e amor incondicional.

Palavras-chave

Aves Marinhas; *Larus fuscus*; *Larus michahellis*; *Morus bassanus*; *Fulmarus glacialis*; *Uria aalge*; *Calonectris borealis*; Reabilitação; Análises Sanguíneas

Resumo

Cada vez mais os ecossistemas marinhos são alvo de pressões antropogénicas, desde a poluição, ao esforço e tipo de pesca, às alterações nas teias tróficas, etc. Muitas destas pressões afectam vários habitats e grupos de animais marinhos, incluindo predadores de topo, sendo que o presente estudo está focado no grupo das aves marinhas. Este grupo inclui bons indicadores das alterações nos ecossistemas costeiros e marinhos, pelo que torna-se importante o seu estudo e a sua conservação.

Na reabilitação de aves marinhas, é importante começar por perceber qual a origem do problema do animal e para isso, as análises sanguíneas apresentam um papel primordial. O principal objetivo do presente trabalho foi a análise da variação de alguns valores hematológicos e bioquímicos de amostras de sangue recolhidas durante o processo de reabilitação de alguns indivíduos admitidos no CRAM.

A contagem diferencial dos heterófilos e a avaliação da morfologia dos eritrócitos foram os principais parâmetros hematológicos analisados. Relativamente aos parâmetros bioquímicos foram analisadas as concentrações de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (AP), Creatina Quinase (CK), Gama Glutamyltransferase (GGT), Lactato Desidrogenase (LDH), Albumina (ALB), Bilirrubina-Direta e Bilirrubina-Total (Bil-D e Bil-T), Creatinina (CREA), Ferro (Fe), Globulina (GLO), Glucose (GLU), Fósforo (P), Colesterol Total (TC), Proteínas Totais (TP), Ureia (UREA) e Magnésio (Mg).

No total foram analisadas 64 amostras de sangue das seis espécies em estudo. Verificou-se que os parâmetros bioquímicos mais associados à causa de entrada “trauma” são a Bil-D, CK, AST, Hct e ALT; para a causa de entrada “doença”, salientam-se os parâmetros Bil-T, LDH, UREA e Pt; e finalmente, para a causa de entrada “oleado”, salientam-se os parâmetros Hct, ALT, LDH, UREA e Pt. Confirmou-se também que o método mais prático para avaliar a concentração de proteínas, o refratómetro, não é o mais indicado a ser utilizado em aves.

Tendo em conta o reduzido número de estudos dedicados à hematologia de aves marinhas, foi possível concluir que é necessário continuar a compilar valores hematológicos e associá-los aos diferentes diagnósticos, tratamentos e resultados em termos de sobrevivência dos indivíduos em centros de recuperação de animais marinhos e no seu ambiente natural.

Keywords

Seabirds; *Larus fuscus*; *Larus michahellis*; *Morus bassanus*; *Fulmarus glacialis*; *Uria aalge*; *Calonectris borealis*; Rehabilitation; Blood Analyses.

Abstract

Marine ecosystems are subject to increasing anthropogenic pressures, including pollution, effort and type of fishing, changes in trophic chains, etc. Many of these pressures affect habitats and groups of species, including top predators. The present study is focused on seabirds. This group of species represents a good bioindicator of changes in coastal and marine ecosystems. Therefore, the monitorization and conservation of these species is very important.

With respect to the rehabilitation of seabirds, it is important to be able to identify the origin of the problem of the animal as soon as it is admitted to the rehab center and as such, blood analysis play a primordial role. Therefore, the main objective of this study was to analyze the variation of some hematological and biochemical values of blood samples collected during the rehabilitation process of some individuals admitted to CRAM.

The differential count of heterophiles, and the erythrocyte morphology evaluation were the main analysed haematological parameters.

The biochemical parameters analysed included the concentration of Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), Alkaline Phosphatase (AP), Creatine Kinase (CK), Gama Glutamyltransferase (GGT), Lactate Dehydrogenase (LDH), Albumin (ALB), Direct-Bilirubin and Total-Bilirubin (Bil-D and Bil-T), Creatinine (CREA), Iron (Fe), Globulin (Glo), Glucose (GLU), Phosphorus (P), Total Cholesterol (TC), Total Protein (TP), Urea (UREA) and Magnesium (Mg).

The rehabilitation process of two individuals were analysed in detail over time and some comparisons were made between analytical methods.

In total, 64 blood samples of the six species under study were analysed.

It was found that the most relevant biochemical parameters for the cause of admission “trauma” were Bil-D, CK, AST, Hct and ALT; for the “disease”, the most relevant biochemical parameters were Bil-T, LDH, UREA and Pt; and finally, for the “oiled” cause of admission the most relevant biochemical parameters were Hct, ALT, LDH, UREA and Pt.

It was also confirmed that the most practical method to evaluate the protein concentration, the refractometer, is not the most suitable method to use in birds. Considering the small amount of studies available on the hematology of seabirds it is important to compile more hematologic values, associate them to different diagnostics, treatments and results in terms of survival in marine animal rehabilitation centres as well as in their natural environment.

Índice

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O CRAM.....	1
1.2 As Aves Marinhas	3
1.2.1 Gaivota-de-asa-escura (<i>L. fuscus</i>).....	4
1.2.2 Gaivota-de-patas-amarelas (<i>L. michahellis</i>)	5
1.2.3 Alcatraz (<i>M. bassanus</i>)	6
1.2.4 Fulmar (<i>F. glacialis</i>).....	7
1.2.5 Airo (<i>U. aalge</i>).....	8
1.2.6 Cagarra (<i>C. borealis</i>)	9
1.3 Análises Hematológicas	10
1.3.1 Heterófilos	11
1.3.2 Eosinófilos.....	11
1.3.3 Basófilos.....	11
1.3.4 Linfócitos	12
1.3.5 Monócitos.....	13
1.3.6 Trombócitos.....	13
1.3.7 Eritrócitos	14
1.4 Análises bioquímicas	18
1.4.1 Enzimas.....	19
1.4.2 Metabolitos	23
1.4.3 Eletrólitos.....	32
1.5 Objetivos	33
1.6 Estrutura	33
CAPÍTULO 2 – MÉTODOS	35
2.1 Procedimentos de admissão e diagnóstico	35
2.2 Recolha e processamento das amostras de sangue.....	35
2.3 Determinação do hematócrito e proteínas totais.....	37
2.4 Observação ao microscópio	38
2.5 MindRay.....	39
2.6 Tratamento de dados	39
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS.....	41
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO	65
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	71
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Abreviaturas

ACP – Análise de Componentes Principais

ANOVA – Análise de Variância com um Fator

ARN – Ácido Ribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

cm – Centímetros

CPRAM - ECOMARE – Centro de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos do Ecomare

dL – Decilitro

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EPOC – Sistema de Análises de Sangue

Fig. – Figura

g – Gramas

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

L – Litro

mmHg – Milímetro de Mercúrio

mmol – Milimole

mg – Miligramas

p.e – Por exemplo

P. I – Índice Policromático

r.p.m – Rotações por minuto

TWBC – Concentração total de leucócitos

μL – Microlitro

U – Unidades

Lista de Figuras

Figura 1 - Gaivota-de-asa-escura, *Larus fuscus* Fonte: (Meirinho et al., 2014)

Figura 2 – Gaivota-de-patas-amarelas, *Larus michahellis* Fonte: (Meirinho et al., 2014)

Figura 3 – Alcatraz, *Morus bassanus* Fonte: (Meirinho et al., 2014)

Figura 4 – *Fulmarus glacialis* (Fonte: iSock¹)

Figura 5 – Airo, *Uria aalge* Fonte: (Meirinho et al., 2014)

Figura 6 – Cagarra, *Calonectris borealis* (Fonte: madeirabirds²)

Figura 7 – Recolha de sangue na pata de uma gaivota, com o auxílio de um cateter.

Figura 8 – Tubo capilar de vidro após centrifugação. CT- comprimento total; CE – comprimento eritrócitos.

Figura 9 – Observação ao microscópio ótico (100x) de um esfregaço de sangue de um indivíduo da espécie *L. michahellis*, com utilização da coloração *Diff-Quick*. É possível observar três heterófilos (H) e um monócito (M).

Figura 10 – Eixos 1 e 2 da ACP das variáveis sanguíneas analisadas.

Figura 11 – Gráfico das variáveis explicativas do eixo 1.

Figura 12 – Gráfico das variáveis explicativas do eixo 2.

Figura 73- *Evolução da concentração das proteínas totais (mg/dL), de um indivíduo da espécie F. glacialis, em função do número de dias de recuperação. Comparação entre dois métodos: mindray (linha azul) e manual (linha vermelha).*

Figura 14 – Evolução do hematócrito (%), de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

Figura 15 – Evolução da concentração (U/L) das enzimas ALT (linha vermelha) e AST (linha azul) de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

Figura 16 - Evolução da concentração (U/L) da enzima CK, de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

Figura 17 - Evolução da concentração (mg/dL) do colesterol total, de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

Figura 88 - Evolução da concentração das proteínas totais (mg/dL) de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação. Comparação entre dois métodos: Mindray (linha azul) e manual (linha vermelha).

Figura 19 - Evolução do hematócrito (%), de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação.

Figura 20 - Evolução da concentração (U/L) das enzimas ALT (linha vermelha) e AST (linha azul) e CK (linha cinza), de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação.

Figura 21 - Evolução da concentração (U/L) da enzima LDH, de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Índice Policromático dos eritrócitos (Adaptado de Dein, 1983; Samour et al., 2016).

Tabela 2 – Alterações no eritrograma de aves. Diagnóstico hematológico e possíveis causas. (Adaptado de: Samour et al., 2016)

Tabela 3 – Comparação entre dois métodos de análise para a concentração das Proteínas Totais. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 4 – Comparação entre dois métodos de análise para a concentração da Creatinina. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 5 - Comparação entre dois métodos de análise para a concentração da Glucose. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 6 - Comparação entre dois métodos de análise para a concentração de Cálcio. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 7 - Comparação entre dois métodos de análise para a percentagem de Hematócrito. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 8 – Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no Mindray da espécie *L. michahellis*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 9 - Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no EPOC, no Refractómetro e medição manual da concentração do hematócrito, da espécie *L. michahellis*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 10 - Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no Mindray da espécie *M.bassanus*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 11 - Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no EPOC, no Refractómetro e medição manual da concentração de proteínas, da espécie *M. bassanus*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 12 – Análise hematológica a indivíduos da espécie *L. michahellis* e *L. fuscus*. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Tabela 13 – Análise hematológica a indivíduos da espécie *M. bassanus*. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos

Tabela 14 – Valores das componentes por causa de entrada.

Tabela 15 - Resultados das ANOVAs para os respectivos parâmetros (em todos os animais).

Tabela 16 – Resultado das ANOVAs não paramétricas para os respetivos parâmetros.

Tabela 17 – Teste não paramétrico (Mann-Whitney) para a enzima ALT para as espécies *L. michahellis* e *M. bassanus*.

Tabela 18 – Análises bioquímicas realizadas para a espécie *L. michahellis*.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 O CRAM

O CRAM (Centro de Reabilitação de Animais Marinhos) localiza-se em Ílhavo no ECOMARE, uma infraestrutura da Universidade de Aveiro. É gerido pela Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem, tendo a credencial de Centro de Recuperação de Animais Selvagens nº 2017 PT 11/CR Rede Nacional de Centro de Recuperação para a Fauna, emitida pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. O CRAM tem como objetivo o resgate e a recuperação de animais marinhos que apresentem qualquer tipo de lesões ou patologias, com o objetivo final de os devolver ao oceano assim que restabeleçam as suas condições normais.

Após os alertas de arrojamentos que são dados na maioria das vezes pela população, os animais são então encaminhados para o CRAM, muitas vezes recolhidos pelos próprios técnicos do centro ou então com a ajuda da Polícia Marítima ou dos Bombeiros. O grupo de animais admitidos no centro com maior representatividade é o grupo das aves marinhas, no entanto, também existem casos de recuperação de répteis como as tartarugas marinhas, pequenos cetáceos e pinípedes.

No caso das aves, uma das principais causas da necessidade de recuperação é mesmo a interação com equipamentos de pesca pois estas são atraídas para os locais de pesca comercial, visto beneficiarem das descargas de peixe indesejado e pelo peixe que se encontra enredado (Louzao et al., 2011). No CRAM, entram muitos indivíduos das espécies *Morus bassanus* (Ganso-patola), *Larus michahellis* (Gaivota-de-patas-amarelas) e *Larus fuscus* (Gaivota-de-asa-escura) com anzóis presos nas asas ou emaranhados em fios de pesca. Sabe-se que a principal causa de mortalidade noutros países é a interação com o palangre, existindo também mortes, no entanto menos frequentes, na pesca de arrasto efetuada em águas costeiras pouco profundas da plataforma continental (Abelló & Esteban, 2011). Em Portugal, a captura accidental de aves marinhas parece ser mais importante nas redes fundeadas (embarcações polivalentes) e nas redes de cerco (Oliveira et al., 2015).

Relativamente às tartarugas, foram estudadas as causas dos arrojamentos destes animais, em especial de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*), no arquipélago do Havaí por Chaloupka et al., (2008), e descobriram que a primeira causa de arrojamento e mortalidade era a fibropapilomatose, uma doença muito comum nesta espécie, com uma taxa de mortalidade de 88%, seguindo-se as causas antropogénicas como as redes de emalhar, as linhas e os anzóis que provocam uma taxa de mortalidade de 69% e 52%, respetivamente (Chaloupka et al., 2008). Estes dados estão de acordo com os valores obtidos no CRAM, pois das 28 tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta* que deram entrada desde 2010, cerca de 50% dos casos são devidos a motivos antropogénicos, mais precisamente a interação com artes de pesca. Também em Portugal, um estudo que analisou 806 tartarugas marinhas arrojadas concluiu que, das tartarugas que puderam ser necropsiadas, a principal causa de arrojamento tinha sido a interação com as pescas (Nicolau et al., 2016).

No que se refere aos cetáceos, os arrojamentos destes animais podem ter variadíssimas causas, desde o emaranhamento em redes de pesca (e.g Ohsumi, 1975) até à desorientação provocada pelos sonares dos navios, quando utilizam a ecolocalização (Luís, Couchinho, & dos Santos, 2014).

No caso dos pinípedes, a captura accidental tem sido uma das principais ameaças e causa do arrojamento destes animais (Goldsworthy & Page, 2007; Karamanlidis et al., 2008). O emaranhamento nas redes de pesca (Karamanlidis et al., 2008) ou no lixo marinho (Moore et al., 2013) pode causar graves lesões e levar ao afogamento destes animais. Em algumas situações, os pinípedes são capturados propositadamente para a comercialização da pele e da massa gorda (Dmitrieva et al., 2013). Muitos deles não acabam por morrer e podem arrojar com problemas secundários devido ao método de captura (Moore et al., 2013).

A reabilitação de animais selvagens não é um processo fácil, muito menos quando se trata de animais marinhos. A principal dificuldade advém do facto de serem colocados limites no espaço e de serem manuseados com alguma frequência, o que eleva o nível de stress dificultando o processo de recuperação. Um centro de reabilitação localizado na

ilha Gran Canaria em Espanha, estudou as principais causas de entrada de aves marinhas num período de dez anos (2003 – 2013) registando a libertação de cerca de 68,34% dos animais que deram entrada, revelando assim uma positiva e elevada taxa de sucesso durante a reabilitação (Montesdeoca et al., 2017). De notar, que este elevado sucesso de reabilitação está relacionado com a causa de entrada da maioria dos animais naquele centro, sendo que muitas das aves admitidas apenas apresentam sinais de desorientação devido à poluição luminosa (Montesdeoca et al., 2017). De qualquer modo, este elevado valor enfatiza a importância e o sucesso da reabilitação mesmo existindo múltiplas dificuldades durante o processo.

Quando os animais são admitidos nos centros de recuperação, é necessário decidir quais os tratamentos mais adequados, principalmente quando não apresentam qualquer tipo de lesão física externa, mas mostram-se débeis, frágeis e na maior parte das vezes com peso inferior ao normal. É por isso necessário saber mais sobre o tipo de morbilidade que o animal apresenta e por esse motivo, sempre que possível, são feitas colheitas de sangue para serem realizados estudos hematológicos e bioquímicos. Em todos os casos, as análises hematológicas e bioquímicas ao sangue são bastante importantes para perceber o estado de saúde do animal.

1.2 As Aves Marinhas

Dentre todos os grupos de aves, são as marinhas as que mais se encontram ameaçadas a nível mundial (Butchart et al., 2004). Entre 1950 e 2010 a população global deste grupo sofreu um decréscimo de aproximadamente 69,7%, atribuindo-se as principais ameaças a causas antropogénicas (Paleczny et al., 2015).

As aves marinhas que fazem parte deste estudo pertencem a três ordens diferentes, Charadriiformes (*Larus fuscus*, *Larus michahellis* e *Uria aalge*), Suliformes (*Morus bassanus*) e Procellariiformes (*Fulmarus glacialis* e *Calonectris borealis*), sendo que a costa Portuguesa possui um papel fundamental para estas espécies migratórias.

Aqui, podem passar o inverno, onde se alimentam e descansam para prosseguirem nas suas rotas migratórias (Ramírez et al., 2008).

Apesar de a Cagarra e a Gaivota-de-asa-escura serem as únicas espécies que se encontram listadas como vulneráveis a nível nacional (Cabral et al., 2005), é importante estudar as alterações de todas as populações de aves marinhas porque apresentam-se como bons indicadores das alterações nos ecossistemas costeiros e marinhos (Paleczny et al., 2015).

1.2.1 Gaivota-de-asa-escura (*L. fuscus*)



Figura 1 - Gaivota-de-asa-escura, *Larus fuscus*
Fonte: (Meirinho et al., 2014)

A Gaivota-de-asa-escura (Fig. 1) é uma das gaivotas com maior abundância em Portugal continental (Meirinho et al., 2014). Apesar de se assemelhar bastante à gaivota *L. michahellis* e ser difícil a sua distinção na fase juvenil, possui um menor tamanho corporal, cerca de 48-56 cm e uma envergadura de asa entre 117-134 cm. Caracterizam-se por possuírem um tom escuro no dorso (Svensson et al., 2012), o que justifica o seu nome.

Podem ser encontradas no noroeste da Europa, desde a Rússia até à Península Ibérica e no inverno distribuem-se na faixa litoral do sudoeste da Europa. (Meirinho et al., 2014). Maioritariamente são encontradas na zona costeira, podendo ser vistas até 100km de distância da zona litoral. Esta distribuição varia de acordo com o seu comportamento alimentar. Indivíduos oportunistas, que aproveitam peixe das redes de pesca, encontram-se mais agregados e junto à costa, enquanto que as aves que realizam a captura podem ser encontradas a maiores distâncias e mais dispersas (Schwemmer & Garthe, 2005).

A sua dieta é variada, podendo ser composta por crustáceos, peixes, estrelas do mar, bivalves (Schwemmer & Garthe, 2005) e resíduos oriundos quer de aterros sanitários quer da saída de esgotos (Meirinho et al., 2014).

De acordo com a IUCN, de um modo geral, a espécie *L. fuscus* está categorizada como “pouco preocupante” (LC- *Least Concern*) (BirdLife International (2018)). Contudo, a população nidificante em Portugal é classificada como “vulnerável” (VU - *Vulnerable*) (Cabral et al., 2005).

1.2.2 Gaivota-de-patas-amarelas (*L. michahellis*)



Figura 2 – Gaivota-de-patas-amarelas, *Larus michahellis*

Fonte: (Meirinho et al., 2014)

A Gaivota-de-patas-amarelas (Fig. 2) é das maiores da família *Laridae*, dado o seu comprimento que varia normalmente entre 52-58 cm e envergadura entre 120-140 cm. Possui uma cor cinza-prateada no dorso e nas asas, que terminam com pontas pretas e pequenas manchas brancas (Svensson et al., 2012).

Em Portugal, está presente em todas as ilhas e ilhéus dos Açores e da Madeira e em praticamente toda a zona costeira Continental (Meirinho et al., 2014). A sua distribuição alargou a partir do momento em que começaram a colonizar áreas urbanas e aumentaram os seus recursos alimentares, que passaram também a ser derivados de atividades humanas como desperdícios e descargas de peixe (Ramos et al., 2009).

A sua alimentação natural passa por várias espécies de peixes pelágicos, caranguejos e insetos (Neves et al., 2006). Sabe-se também que funciona como espécie predadora de outras aves marinhas (Catry et al., 2010; Matias & Catry, 2010).

Numa visão geral, a população de gaivotas-de-patas-amarelas encontra-se em crescimento e segundo a IUCN está listada como “pouco preocupante” (LC – *Least Concern*) (BirdLife International (2018)) apesar de alguns indivíduos serem acidentalmente capturados em artes de pesca como redes e palangres (Meirinho et al., 2014).

1.2.3 Alcatraz (*M. bassanus*)



Figura 3 – Alcatraz, *Morus bassanus*
Fonte: (Meirinho et al., 2014)

Também conhecido por Ganso-patola, o Alcatraz (Fig. 3) é a maior ave marinha que faz passagem pela costa portuguesa. Em média, atingem um comprimento entre 85-97 cm e envergadura entre 170-192 cm. Em adultos, o seu corpo apresenta-se maioritariamente branco à exceção da cabeça amarela e das pontas das asas pretas, contrastando assim com os indivíduos juvenis que apresentam uma

plumagem castanha-acinzentada (Svensson et al., 2012).

O Alcatraz pode ser encontrado em todo o Atlântico Norte, desde o Canadá até ao norte da Europa, sendo este o local preferencial para reprodução. Durante a época de invernada, encontra-se maioritariamente no Mediterrâneo, nas zonas costeiras do oceano Atlântico Europeu e África Ocidental. Devido a esta localização de invernada, a abundância em Portugal eleva-se entre os meses de setembro a março por fazer parte do seu trajeto migratório.

Por ser uma espécie exclusivamente marinha e apenas utilizar zonas terrestres costeiras para reprodução, a sua alimentação é baseada em peixes pelágicos, capturados por mergulho, como cavalas, carapau, sardinhas, entre outros. Aproveitam também rejeições das embarcações para se alimentarem (Meirinho et al., 2014).

Apesar de alguns indivíduos serem capturados acidentalmente pelas artes pesca (Oliveira et al., 2015) e de existirem evidências de contaminação por elementos tóxicos

(Mendes et al., 2008), a população de alcatraz segundo a IUCN está listada como “pouco preocupante” (LC – *Least Concern*) (BirdLife International (2018)).

1.2.4 Fulmar (*F. glacialis*)



Figura 4 – *Fulmarus glacialis*
(Fonte: iStock¹)

O Fulmar (Fig. 4) é uma espécie que se assemelha muito à gaivota. Possui um comprimento médio de 43-52 cm e uma envergadura de 101-117 cm. A plumagem da zona dorsal apresenta-se com uma coloração cinza claro e a parte ventral e da cabeça brancas (Svensson et al., 2012).

É uma ave marinha de ocorrência acidental e rara (Cabral et al., 2005) e por isso existem poucos registos em Portugal continental. A sua distribuição concentra-se no norte do Atlântico, principalmente na zona do Reino Unido e Irlanda (Svensson et al., 2012).

A sua alimentação é bastante variada, entre crustáceos, peixe e até carne de baleia no caso de indivíduos encontrados mortos (Svensson et al., 2012).

De um modo geral, esta espécie apresenta uma ampla distribuição e por isso, segundo a IUCN encontra-se listada como “pouco preocupante” (LC – *Least Concern*) (BirdLife International (2018)), embora haja alguma controvérsia relativamente ao estatuto de conservação desta população.

¹<https://www.istockphoto.com/pt/fotos/fulmar?sort=mostpopular&mediatype=photography&phrase=fulmar>

1.2.5 Airo (*U. aalge*)



Figura 5 – Airo, *Uria aalge*
Fonte: (Meirinho et al., 2014)

O Airo (Fig. 5) é um animal relativamente pequeno, como um comprimento médio entre 38-46 cm e envergadura entre 61-73 cm. Apresentam a parte dorsal do corpo com uma tonalidade castanho escura e a zona ventral branca (Svensson et al., 2012).

A nível global, a sua distribuição concentra-se no Atlântico e Pacífico Norte (Meirinho et al., 2014), contudo até meados do século XX, as ilhas das Berlengas apresentavam-se como um local preferencial para a sua nidificação (Teixeira, 1983).

A época reprodutora desta espécie inicia-se em maio prolongando-se até agosto.

Os indivíduos desta espécie não se afastam muito das zonas costeiras, frequentando normalmente zonas mais baixas da plataforma continental (Meirinho et al., 2014) para se alimentar.

Esta ave marinha alimenta-se sobretudo de pequenos peixes pelágicos (Meirinho et al., 2014) perseguindo as suas presas debaixo de água.

Numa visão geral, a população da espécie *U. aalge* apresenta tendência a aumentar e segundo a IUCN encontra-se listada como “pouco preocupante” (LC – *Least Concern*) (BirdLife International (2018)). Contudo, existem algumas ameaças que poderão estar na origem do seu desaparecimento das Berlengas como a introdução de redes de emalhar (Munilla, Díez, & Velando, 2007), a diminuição da disponibilidade das suas presas, causada pela pesca excessiva, e a contaminação por hidrocarbonetos (Meirinho et al., 2014).

1.2.6 Cagarra (*C. borealis*)



Figura 6 – Cagarra, *Calonectris borealis*
(Fonte: madeirabirds²)

O comprimento da Cagarra (Fig. 6) varia entre 50–56 cm e possui uma envergadura entre 118-126 cm. O dorso do seu corpo é cinzento-acastanhado e a parte ventral branca com as extremidades também castanhas. O seu reconhecimento é facilitado pelo bico amarelo (Svensson et al., 2012).

Pode ser encontrada facilmente ao longo de toda a costa portuguesa, contudo o seu avistamento é mais provável durante a época de reprodução, entre abril e outubro. As Berlengas são o único local de nidificação em Portugal Continental (Cabral et al., 2005). Os ninhos localizam-se em zonas rochosas sendo muito raro encontrar ninhos expostos (Meirinho et al., 2014).

A sua alimentação baseia-se em pequenos peixes pelágicos, cefalópodes e crustáceos (Meirinho et al., 2014) que adquire por captura, mas também são atraídos pelas rejeições das embarcações de pesca (BirdLife International (2018)).

De um modo geral, a população de Cagarra tem tendência a diminuir, e segundo a IUCN encontra-se listada como “pouco preocupante” (LC - *Least Concern*) (BirdLife International (2018)). Contudo, em Portugal continental está classificada como vulnerável. Esta classificação é justificada pelo facto de a população ser reduzida e ser encontrada apenas numa única localização (Cabral et al., 2005).

²<https://www.madeirabirds.com/cory-shearwater-calonectris-borealis>

Tal como já foi referido anteriormente, os estudos hematológicos e bioquímicos são de importância extrema logo após a entrada de um animal no CRAM. É um dos primeiros passos para a avaliação do estado de saúde do indivíduo, permitindo desta maneira, a decisão sobre o melhor tratamento a fornecer para a recuperação do animal.

1.3 Análises Hematológicas

Os estudos hematológicos fornecem-nos informação relativamente ao sistema hematopoético e sobre a resposta imunológica, fazendo-se para isso contagem total de eritrócitos (ou glóbulos vermelhos), leucócitos (ou glóbulos brancos) e contagem diferencial de leucócitos (Newman et al., 2000). Quando se fazem colheitas de sangue utiliza-se parte da amostra para a realização de esfregaços. Por sua vez, após a coloração, estes poderão ser observados ao microscópio ótico para se efetuarem as contagens descritas anteriormente.

A coloração permite-nos diferenciar os vários tipos de glóbulos brancos existentes, sendo que as mais frequentemente utilizadas para os estudos hematológicos são a de Wright, Giemsa e Romanowsky. Todas consistem na combinação de um corante básico e um corante ácido (que podem variar), depois dos esfregaços terem sido submetidos a um fixador.

No caso da coloração *Diff-Quick*, o fixador normalmente é o metanol e os corantes ácidos e básicos podem variar conforme o fabricante (Marcos & Santos, 2011). Desta maneira, é possível diferenciar os ácidos nucleicos e os grânulos dos basófilos pelos seus tons azulados e a hemoglobina dos eritrócitos, os grânulos citoplasmáticos dos heterófilos e eosinófilos pela sua coloração rosada (Clark, Boardman, & Raidal, 2009). Esta diferenciação de cores em conjunto com a morfologia celular permite-nos, de uma maneira mais simplificada, identificar e distinguir os vários leucócitos existentes.

1.3.1 Heterófilos

No caso das aves, os leucócitos que mais prevalecem são os heterófilos (equivalente aos neutrófilos nos mamíferos). Pertencem ao grupo dos leucócitos granulócitos juntamente com os eosinófilos e basófilos, por possuírem grânulos específicos no citoplasma, característica que os distingue dos restantes glóbulos brancos. Os heterófilos possuem uma forma arredonda com algumas irregularidades (Clark et al., 2009), núcleo basófilo normalmente lobulado (entre 2 a 3 lóbulos) (Lucas & Jamroz, 1961) e elevado número de grânulos acidófilos no citoplasma, podendo, por vezes, tapar o núcleo devido à sua elevada densidade (Clark et al., 2009). São considerados a primeira linha de defesa do organismo e atuam sobretudo na fagocitose de bactérias durante a resposta inflamatória (T. W. Campbell, 2012b).

1.3.2 Eosinófilos

Os eosinófilos possuem morfologia e tamanho muito semelhantes à dos heterófilos (Mitchell & Johns, 2008) podendo ser confundidos facilmente. O núcleo é lobulado, normalmente com dois lóbulos, sendo que a cromatina cora com mais intensidade do que nos heterófilos. Os grânulos citoplasmáticos coram de azul claro exibindo deste modo basofilia. As suas características como o número, forma, tamanho e tonalidade variam de acordo com a espécie (Clark et al., 2009). Existem estudos que afirmam que o seu papel em aves é atuar no caso de infeções por parasitas (Maxwell & Burns, 1985).

1.3.3 Basófilos

O último grupo dos granulócitos são os basófilos que como o nome indica, exibem uma intensa basofilia nos seus grânulos citoplasmáticos. Devido à sua elevada densidade, podem tapar o núcleo, que normalmente apresenta um único lóbulo com forma redonda ou oval (Clark et al., 2009; Mitchell & Johns, 2008). Relativamente ao tamanho, são um pouco menores do que os heterófilos (Mitchell & Johns, 2008). Ainda não se conhece especificamente a sua função nas aves, mas sabe-se que estão relacionados com a fase

aguda da inflamação (Montali, 1988) e que possuem histamina nos seus grânulos tal como acontece nos mamíferos (Campbell, 2012).

1.3.4 Linfócitos

Os linfócitos juntamente com os monócitos podem ser referidos como células mononucleares. No entanto, os linfócitos são as células mononucleares que mais frequentemente são encontradas, e em algumas espécies de aves, podem ser o tipo de leucócito mais encontrado no sangue periférico (Clark et al., 2009). A sua forma nas aves é idêntica à encontrada nos mamíferos e possuem uma razão núcleo/citoplasma elevada (Mitchell & Johns, 2008).

A morfologia destas células apresenta variações no mesmo indivíduo, existindo três tipos de linfócitos: pequenos, médios e grandes, não havendo variações significativas entre diferentes espécies de aves. Os linfócitos mais pequenos possuem núcleo arredondado e cromatina condensada, sendo também as células leucocitárias mais pequenas. Os de tamanho intermediário, possuem dimensões idênticas aos granulócitos e o seu núcleo possui uma forma arredondada irregular, com cromatina menos condensada que os anteriores (Clark et al., 2009). Estes dois tipos de linfócitos são chamados de leucócitos reativos e são encontrados em pequeno número nos esfregaços de sangue periférico de aves saudáveis (Mitchell & Johns, 2008). Os linfócitos maiores podem ser comparados aos monócitos relativamente às suas dimensões. O núcleo varia geralmente entre uma forma arredondada a oval e possui cromatina pouco condensada quando comparado com a dos outros linfócitos (Clark et al., 2009). O citoplasma dos três tipos de células referidas anteriormente apresenta basofilia e, por norma, não contem grânulos. Os grânulos azurófilos são os únicos que eventualmente poderão aparecer (Clark et al., 2009; Mitchell & Johns, 2008).

1.3.5 Monócitos

Os monócitos são os leucócitos com maiores dimensões. Não possuem forma definida, no entanto, na maior parte das vezes, podem ser encontrados com formato arredondado. O núcleo varia a sua conformação entre redonda e oval. Apresenta a cromatina pouco condensada e pode ser composto por lóbulos. O citoplasma possui pequenos grânulos eosinófilos que não são facilmente visíveis, podendo também existir pequenos vacúolos no citoplasma (Clark et al., 2009; Mitchell & Johns, 2008). Verifica-se a existência de diferenças morfológicas nos monócitos do sangue de um indivíduo, no entanto, não existem diferenças significativas na sua morfologia entre diferentes espécies (Clark et al., 2009). A função destas células está relacionada com a fagocitose de organismos invasores, e por isso transformam-se em macrófagos após realizarem a migração para os tecidos lesionados (Mitchell & Johns, 2008). Elevados níveis de monócitos no sangue podem ser vistos em casos de doenças infecciosas ou inflamatórias como a aspergilose (Mitchell & Johns, 2008), em infeções pela bactéria *Chlamydophila psittaci*, granulomas bacterianos e necrose massiva de tecido (Greiner & Ritchie, 1994; Hawkey et al., 1983) podendo também ser encontrados em aves que possuam uma dieta deficiente em zinco (Wight et al., 1980).

1.3.6 Trombócitos

Estas células são pequenas e com estrutura similar à dos linfócitos, tornando por isso difícil a sua distinção. Os trombócitos possuem uma forma arredondada, núcleo com cromatina bastante condensada (Clark et al., 2009; Mitchell & Johns, 2008) e citoplasma basófilo (Clark et al., 2009).

No citoplasma de alguns trombócitos, por vezes, é possível encontrar pequenos grânulos de natureza eosinófila e azurófila (Clark et al., 2009). A sua função é idêntica à das plaquetas nos mamíferos. Produzem tromboplastina e contribuem para a homeostase celular (Clark et al., 2009; Mitchell & Johns, 2008). A fagocitose nestas células não é muito relevante, no entanto em alguns trombócitos, são visíveis pequenas projeções

citoplasmáticas (Clark et al., 2009) indicativas da presença deste processo de remoção de corpos estranhos ao organismo.

1.3.7 Eritrócitos

Os eritrócitos das aves possuem uma característica que os diferencia dos mamíferos, a presença de núcleo. Nos esfregaços de sangue vistos ao microscópio ótico e corados com colorações Romanowsky é possível observar uma estrutura elíptica, forma essa que o núcleo, de cromatina basófila bastante condensada, também acompanha. O citoplasma apresenta-se acidófilo (Mitchell & Johns, 2008).

No mesmo esfregaço, é possível encontrar diferentes formas de eritrócitos que correspondem às várias fases do seu desenvolvimento, no entanto, no sangue de aves saudáveis o eritrócito maduro, ou seja, o que se encontra na última fase de maturação, é o tipo de célula predominante (Clark et al., 2009). Num eritrócito mais imaturo a cromatina encontra-se menos condensada, a forma da célula e do núcleo são mais arredondados e apresentam o citoplasma basófilo (Mitchell & Johns, 2008), quando comparados com um eritrócito maduro.

Ao penúltimo estágio do desenvolvimento dos eritrócitos dá-se o nome de eritrócito policromático. Estes caracterizam-se pela presença de citoplasma levemente basófilo, apresentando desta maneira uma coloração azulada devido à quantidade de ARN. Para além disto, a cromatina também se apresenta menos condensada (Clark et al., 2009). A percentagem de eritrócitos policromáticos tende a ser maior nas aves porque, neste grupo, os eritrócitos têm um tempo de meia-vida mais curto (Mitchell & Johns, 2008). Contudo, o aumento do número destas células pode também ser devido ao aumento da eritropoiese em casos de anemia (Clark et al., 2009).

Os reticulócitos são os eritrócitos que apresentam agregações granulares de ARN às quais se dá o nome de retículo. No entanto num esfregaço corado, muitos dos eritrócitos podem apresentar algum ARN citoplasmático residual e por isso apenas se dá o nome de reticulócito aos eritrócitos que apresentam o retículo em forma de anel incompleto à volta do núcleo (Clark et al., 2009), sendo então, a morfologia e a disposição do retículo no citoplasma o fator predominante para a sua classificação.

Os rubrócitos, têm uma dimensão menor, quando comparados com os eritrócitos maduros, e uma forma mais arredondada tanto da célula como do núcleo. Por sua vez, apresentam cromatina menos condensada e o citoplasma aparece com uma tonalidade mais azulada devido à sua basofilia (Clark et al., 2009; Mitchell & Johns, 2008). Estes possuem uma razão núcleo/citoplasma elevada, e por isso o citoplasma apenas ocupa uma pequena parte da célula (Clark et al., 2009).

Às células mais imaturas do processo da eritropoiese, dá-se o nome de eritroblastos. Estas aparecem em pequeno número no sangue das aves, e são reconhecidas por não possuírem núcleo (Clark et al., 2009).

Para avaliar o estado morfológico dos eritrócitos pode-se recorrer ao Índice Policromático (PI) (Tabela 1) (Dein, 1983). Para isso, estima-se a quantidade de células policromáticas utilizando uma escala que varia desde 1 a 5 (Pendl, 2008). Por se considerar que todas as células imaturas são policromáticas, obtém-se um conjunto de células bastante heterogéneo. Contudo, o PI permite fazer uma avaliação generalizada do estado dos eritrócitos (Samour et al., 2016).

A existência de alterações nos eritrócitos leva a modificações no tecido eritropoético, estado também muito relacionado com a tensão de oxigénio nos tecidos (Samour et al., 2016).

Ao conjugar os valores do Hct com os valores de concentração de proteínas, é possível diagnosticar alterações na atividade eritropoética (Tabela 2). Estes dados facilitam a investigação da origem do problema.

Tabela 1 – Índice Policromático dos eritrócitos (Adaptado de: Dein, 1983; Samour et al., 2016).

ÍNDICE	% CÉLULAS IMATURAS	MORFOLOGIA	INTERPRETAÇÃO
1	0	Homogeneidade na forma e textura dos eritrócitos; quase sem células policromatófilas	Fisiológica Depressão da eritropoiese
2	< 10	Presença de poucas células policromatófilas	Fisiológica
3	10-20	Muitas células policromatófilas rodeadas por eritrócitos maduros	Resposta regenerativa moderada
4	20-50	Número significativo de células policromatófilas	Resposta regenerativa acentuada
5	> 50	Grande número de células policromatófilas; poiquilcitose significativa	Resposta regenerativa e degenerativa rigorosas (células binucleares, divisões nucleares anormais, estágios mitóticos, poiquilcitose nuclear e citoplasmática)

Tabela 2 – Alterações no eritrograma de aves. Diagnóstico hematológico e possíveis causas (Adaptado de: Samour et al., 2016).

Resultados Análises	Diagnóstico Hematológico		Causas Possíveis
Hct > 55%; Pt = 2-3	Eritropoiese aumentada	Policitemia	Policitemia vera (raro), adaptação a elevadas altitudes, deficiente ligação entre o oxigénio e os eritrócitos, doenças respiratórias crónicas e doenças cardiovasculares.
Hct < 35%; Pt = 2-5		Anemia hemorrágica	Traumatismos, distúrbios na coagulação, infeções, septicemias, toxinas no sangue, úlceras e neoplasias.
Hct < 35%; Pt = 4-5		Anemia hemolítica	Malformação genética, hemoparasitas, septicemias, intoxicações, doenças autoimunes, neoplasias e queimaduras.
Hct < 35%; Pt = 1-2	Eritropoiese diminuída	Anemia depressiva	Deficiência em ferro ou hemoglobina, falta de fatores eritropoéticos e danos na medula óssea.

1.4 Análises bioquímicas

Tal como já foi referido, para além das análises hematológicas, as análises bioquímicas também têm bastante relevância na avaliação do estado de saúde do indivíduo. A integridade das células pode ser avaliada por análises a enzimas como: a Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (AP), Creatina Quinase (CK), Gama Glutamyltransferase (GGT) e Lactato Desidrogenase (LDH). É importante também avaliar a capacidade funcional de um determinado órgão, e para isso fazem-se análises a metabolitos como: Albumina (ALB), Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total (Bil-D e Bil-T), Creatinina (CREA), Ferro (Fe), Globulina (GLO), Glucose (GLU), Fósforo (P), Colesterol Total (TC), Proteínas Totais (TP) e Ureia (UREA). É também possível analisar alguns eletrólitos, como por exemplo o Magnésio.

Para além destes testes existem muitas outras possibilidades, no entanto, só estes foram os seleccionados para utilização, de acordo com o equipamento utilizado. Mesmo assim, alguns não foram analisados devido à pequena amostra de sangue que foi possível retirar de algumas aves (este assunto será aprofundado a seguir).

É bastante importante ter em conta que os intervalos de referência para as aves não funcionam do mesmo modo ou tão bem como para os mamíferos para os quais existe uma significância estatística. Isto deve-se aos vários estudos realizados neste grupo de animais e que analisam variações bioquímicas em diferentes tipos de doença. No caso das aves, como muitos dos valores publicados foram obtidos em laboratórios de diagnóstico, onde a maioria das aves que chegam não se encontram saudáveis, os intervalos de referência não podem ser considerados como valores correspondentes a aves consideradas saudáveis. Para além disto, existem também variações nos intervalos de referência entre laboratórios devido aos diferentes testes realizados e equipamentos utilizados. Para que possuam significância estatística, é necessário que os valores dos intervalos de referência sejam obtidos a

partir de aves livres de qualquer tipo de infecção e mantidas por longos períodos de tempo com dietas adequadas e controladas (Hochleithner, 1994).

1.4.1 Enzimas

É relevante enfatizar a importância da análise enzimática, uma vez que a distribuição de enzimas nas células pode variar. De facto, as enzimas podem ser encontradas no citoplasma (ALT, AST e LDH), na mitocôndria (glutamato desidrogenase (GLDH) e na membrana citoplasmática (AP e GGT) (Lumeij, 2008).

Alanina Aminotransferase (ALT)

A enzima Alanina Aminotransferase tem como principal função catalisar a interconversão de aminoácidos e oxoácidos pela transferência de grupos amina (Hochleithner, 1994). Assim o α -cetoglutarato e a L-alanina são convertidos em L-glutamato e piruvato sendo que este último composto irá ser reduzido na presença de LDH como será explicado mais à frente. Em humanos, esta enzima é específica do fígado. No entanto, em aves, existem casos de indivíduos com graves danos hepáticos e com atividade normal de ALT (Hochleithner, 1994).

Analisar isoladamente valores elevados desta enzima possui pouca relevância em aves porque esta pode apresentar-se elevada em quase todos os tecidos. Como a sua atividade é mais elevada nos eritrócitos do que no plasma, é necessário ter atenção à ocorrência de hemólise que pode influenciar os seus valores. A atividade desta enzima é também influenciada pela idade dos indivíduos (Hochleithner, 1994) e por variações sazonais (Gerlach, 1979).

Aspartato Aminotransferase (AST)

A Aspartato Aminotransferase pertence ao mesmo grupo de enzimas que a ALT, as transaminases. O seu objetivo é catalisar a interconversão de aminoácidos, tal como a ALT. Transforma então, os ácidos L-aspartato e α -cetoglutarato em ácido oxalacético e L-glutamato. Nas aves, a sua distribuição nos tecidos varia conforme a espécie, sendo que já foi encontrada atividade no fígado, músculo esquelético,

coração, cérebro e rins (Hochleithner, 1994). Normalmente níveis elevados da atividade desta enzima estão relacionados com danos a nível hepático ou muscular. No entanto, a informação é mais fidedigna se os níveis da sua atividade forem analisados com testes a enzimas mais específicas (Lumeij & Westerhof, 1987). Por exemplo, a CK é usada para diferenciar danos musculares de danos hepáticos (Hochleithner, 1994).

Os valores desta enzima variam conforme a idade e espécie do indivíduo (Hochleithner, 1994). Alguns autores referem que atividades de AST superiores a 230 U/L são consideradas valores anormais (Hochleithner, 1994), enquanto que outros mencionam atividades de AST normais, com valores inferiores a 275 U/L (Thrall et al., 2004). É importante ter em consideração que o uso de alguns fármacos podem elevar a atividade desta enzima (Capitelli & Crosta, 2013), como é o caso do Itraconazol que é bastante utilizado na prevenção da aspergilose em aves.

Fosfatase alcalina (ALP)

A função da Fosfatase Alcalina está relacionada com a transferência de energia na troca de iões através da membrana celular. A sua atividade ocorre predominantemente no duodeno e nos rins (Hochleithner, 1994). O seu papel relaciona-se também com o metabolismo do cálcio e do fósforo (Viñuela et al., 1991), apresentando elevados níveis de atividade nos osteoblastos (Fowler, 1986). Esta enzima participa nas atividades de condrogénese e osteogénese (Viñuela et al., 1991), tendo por isso um papel importante durante o crescimento das aves.

De facto, esta enzima apresenta variações fisiológicas de maneira que indivíduos juvenis exibem atividade de ALP mais elevada em comparação com os adultos. Isto poderá ser explicado pela redução das taxas de crescimento ou regeneração osteológica em indivíduos mais velhos. Sabe-se também que a atividade de ALP é aumentada antes da postura em fêmeas, e que apresenta variações sazonais (Hochleithner, 1994).

Ao contrário das outras enzimas, o incremento da atividade da ALP não resulta de danos causados a nível celular com posterior libertação da enzima para o plasma, mas sim de um aumento da atividade celular ou da sua síntese. Valores aumentados

podem ser causados por danos hepáticos, hiperparatiroidismo e enterites. Dietas deficientes em zinco podem levar a uma diminuição da atividade de ALP (Hochleithner, 1994).

Creatina Quinase (CK)

A Creatina Quinase é formada por três isoenzimas, duas dos músculos (esquelético e cardíaco) e uma do tecido cerebral. Apresenta um papel fundamental para o bom funcionamento muscular porque torna o ATP disponível para que ocorra contração muscular (Hochleithner, 1994; Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

A CK é bastante importante também porque permite fazer a distinção entre danos celulares no músculo ou no fígado. A sua atividade está sujeita a variações fisiológicas tal como em quase todas as enzimas sendo que em aves é bastante sensível ao stress e ao exercício. Quando os valores desta enzima se apresentam elevados, é de interesse perceber qual das isoenzimas se encontra verdadeiramente elevada. Por isso, em mamíferos é possível fazer a separação destas três isoenzimas através da eletroforese. Apesar de ser um procedimento bastante interessante não existe nenhuma informação de que tenha sido utilizado em aves. Valores elevados de CK podem estar relacionados com a necrose de células musculares, convulsões, injeções intramusculares, deficiência em vitamina E e selénio, neuropatias, toxicidade de chumbo e por infeção de bactérias da família Chlamydiaceae (Hochleithner, 1994).

Gama Glutamyltransferase (GGT)

A atividade da enzima Gama Glutamyltransferase (GGT) é mais preponderante nos epitélios da vesícula biliar e dos túbulos renais das aves (Harr, 2002). A sua função está relacionada com a transferência de aminoácidos. Para isso, quebra o grupo gama-glutamil e transfere-o até um recetor apropriado (Hochleithner, 1994).

Vários autores referem que para a análise desta enzima deve-se dar preferência na preparação da amostra à utilização de EDTA em vez da heparina, por esta poder interferir com os reagentes causando turbidez (Hochleithner, 1994).

Níveis elevados da GGT no plasma podem estar relacionados com danos hepatocelulares e doenças renais, no entanto, em aves, a significância da atividade desta enzima no plasma ainda é pouco conhecida. Em pombos utilizados em corridas, funciona como um indicador específico para doenças no fígado (Hochleithner, 1994).

Em aves, os valores de atividade desta enzima, encontram-se normalmente abaixo dos níveis de sensibilidade de muitos testes e equipamentos (Hochleithner, 1994). Apesar de não existirem intervalos de referência tabelados para a GGT, medições entre 0-10 U/L são consideradas normais em aves exóticas (Harr, 2002).

Lactato desidrogenase (LDH)

A enzima Lactato Desidrogenase atua no processo da glicólise, podendo ser encontrada em vários tecidos, principalmente no músculo, coração, fígado, rins, ossos e em células como nos eritrócitos. Visto que os glóbulos vermelhos contêm elevadas atividades desta enzima, a ocorrência de hemólise pode levar a uma falsa elevação dos seus valores.

A LDH é composta por cinco isoenzimas que aparecem em vários tecidos, e por isso não é uma enzima específica. É possível fazer a sua separação através de eletroforese. Este passo facilitaria o diagnóstico e a percepção de qual a verdadeira causa do aumento da sua atividade, ou seja, permitiria a identificação do órgão que foi realmente afetado. No entanto, apesar de ser uma ajuda ao diagnóstico, este passo é pouco utilizado em laboratórios veterinários. Além disso, esta enzima é influenciada pelo gênero e por variações sazonais (Hochleithner, 1994).

Em alguns grupos de aves, incrementos dos níveis da LDH estão normalmente relacionados com doenças hepáticas. É possível saber se os danos provocados no fígado serão permanentes, uma vez que a atividade da LDH aumenta e diminui muito mais rapidamente do que a atividade da AST em aves (Tietz et al., 1986).

1.4.2 Metabolitos

Proteínas totais (TP)

As proteínas plasmáticas têm como principais funções o transporte de diversas substâncias como por exemplo as hormonas, regular a pressão osmótica do plasma, contribuir para a imunidade do sistema, auxiliar na função tampão e regulação de enzimas (Boettcher Gallardo, 2004). Nas aves, a albumina é a proteína que ocupa a maior parte da fração proteica (cerca de 40-60%) e é somente produzida no fígado (Schmidt et al., 2007). Desta maneira, a medição dos seus níveis auxilia no diagnóstico de danos hepáticos.

A análise das proteínas plasmáticas tanto pode ser realizada no plasma como no soro do sangue, no entanto, é preciso ter em conta que a concentração no plasma está sujeita a variações devido à presença de fibrinogénio (Lumeij, 2008).

A metodologia utilizada também pode influenciar os valores das proteínas plasmáticas. No presente estudo, o método utilizado para determinar os níveis de proteína foi o método químico, mais precisamente o método de biureto. Este procedimento consiste na ligação de iões de cobre às moléculas de proteína (quando presentes numa solução alcalina) formando-se assim um complexo azul violeta cuja absorvância é medida (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008). Para além deste método, é também possível fazer a medição da concentração de proteínas no plasma com o auxílio de um refratómetro ou procedendo-se à realização de eletroforese.

A desvantagem do refratómetro subsiste quando as amostras contêm elevadas concentrações de compostos refrativos (ex: lípidos e glucose), o que pode levar a medições imprecisas (Lumeij & de Bruijne, 1985; Lumeij, de Bruijne, & Kwant, 1990). Relativamente ao método de biureto, apresenta algumas discrepâncias na determinação da concentração de albumina. Estas variações são causadas pela presença de albumina humana nos controlos e padrões utilizados (Lumeij, 2008).

Aumentos nos valores das proteínas totais poderão estar relacionados com processos inflamatórios (agudos ou crônicos) observando-se simultaneamente diminuição na razão albumina/globulina devido à elevação das globulinas. Esta razão tem elevado valor clínico uma vez que em situações de aspergilose, por exemplo, o valor da TP pode estar normal, no entanto a razão encontra-se diminuída pelo aumento das globulinas. Quando as aves se encontram desidratadas é possível observar um aumento da albumina, no entanto em doenças hepáticas é possível verificar uma diminuição conjunta das proteínas totais e da razão albumina/globulina.

É também possível observar elevação das proteínas plasmáticas antes e durante a postura em aves. Este aumento nas fêmeas é induzido pelo estrogénio. Desta maneira, o incremento de proteínas pode ser explicado pela necessidade proteica para a formação do ovo (Hochleithner, 1994).

Baixas concentrações das proteínas plasmáticas podem ser causadas por perdas (lesões ou hemorragias), diminuição da sua produção (deficiência hepática, má alimentação, má digestão e má absorção) e por diminuição por sequestro na ascite aviar (Bowes et al., 1989) observado em casos de desnutrição, infeções agudas e hemorragias (Boettcher Gallardo, 2004).

Bilirrubinas (Bil-T e Bil-D)

A bilirrubina pode ser medida de duas formas, a Bilirrubina Direta (Bil-D) e a Total (Bil-T). Os dois testes baseiam-se na utilização do ácido sulfanílico diazotado, que ao combinar-se com a bilirrubina e pela ação de um surfactante leva à formação da substância azobilirrubina, um produto avermelhado. A absorvância desta substância é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina.

Nas aves as concentrações de bilirrubina são praticamente indetetáveis, isto porque este grupo de animais não possui a enzima biliverdina redutase cuja função é a transformação da biliverdina (principal pigmento da bÍlis das aves) em bilirrubina (Lin et al., 1974; Lind, Gronwall, & Cornelius, 1967). No entanto, outros autores afirmam

que as aves possuem a enzima biliverdina redutase embora em concentrações muito baixas (Thrall et al., 2004).

O valor clínico da bilirrubina nas aves ainda é desconhecido ou muito pouco conhecido podendo variar entre as espécies (Hochleithner, 1994). A relação entre o valor dos dois testes de bilirrubina permite uma diferenciação entre icterícia hemolítica, icterícia hepática ou biliar. Contudo, os valores obtidos muitas vezes encontram-se abaixo do limite de detecção do equipamento. Por este motivo não é possível inferir sobre o tipo de icterícia que poderá estar presente.

Creatinina (CREA)

Os níveis de Creatinina são medidos através do método de Jaffe. Este método consiste na reação entre a CREA e o ácido pícrico, formando-se um complexo na presença de uma solução alcalina (Hochleithner, 1994).

Este composto é sintetizado a partir do catabolismo da fosfocreatina (usada para armazenar energia no músculo) a uma taxa constante durante as contrações musculares (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000) e é exclusivamente excretada pelos rins, tendo por isso bastante importância na avaliação da taxa de filtração glomerular. Os seus níveis são diretamente proporcionais à massa muscular e inversamente proporcionais à idade (Work et al., 1999). O intervalo de referência em aves não apresenta diferenças significativas entre as espécies variando entre 0,1 – 0,4 mg/dL (Hochleithner, 1994).

Os valores de CREA elevados no plasma podem estar relacionados com danos nos rins mais especificamente com a diminuição da taxa de filtração, peritonites relacionadas com o ovo, septicémia, trauma renal e compostos nefrotóxicos (Harrison & Harrison, 1986). Podem apresentar-se diminuídos através do aumento da sua excreção que pode ocorrer devido à diminuição da ingestão de alimento ou a outros agentes stressantes (Work et al., 1999).

Em aves este teste não fornece informações precisas sobre o funcionamento dos rins, visto que neste grupo é a creatina que é expulsa por via urinária e não a creatinina. Além disso, os níveis fisiológicos e patológicos encontram-se bastante próximos,

sendo que os primeiros permanecem muitas vezes abaixo dos níveis de detecção dos métodos e equipamentos utilizados (Hochleithner, 1994).

Ferro (Fe)

O ferro participa na respiração celular fazendo o aporte de oxigénio no grupo heme da molécula de hemoglobina. Para a análise bioquímica é necessário ter atenção ao estado da amostra, porque se esta se encontrar hemolisada poderá produzir valores de Fe sobrevalorizados (Hochleithner, 1994).

Com o passar do tempo, a molécula de hemoglobina dos eritrócitos envelhece e é decomposta. O ferro é absorvido no trato gastrointestinal para poder ser utilizado novamente e é transportado no plasma ligado à transferrina (Hochleithner, 1994).

A hemossiderina é um pigmento no qual o ferro, derivado da hemoglobina, é armazenado. Este pigmento pode ser conservado no fígado e ocasionalmente no coração. Quando existe um armazenamento em excesso, desenvolve-se uma doença chamada hemocromatose que pode ter causa hereditária, em dietas ricas em ferro ou na presença de anemia, podendo causar danos patológicos nos tecidos (Lumeij, 2008).

Em algumas espécies, no período que antecede a postura, os níveis de ferro podem apresentar-se elevados, bem como em situações de perda de sangue (Hochleithner, 1994).

Glicose (Glu)

Os hidratos de carbono, mais propriamente a glicose, são responsáveis pelo fornecimento de energia indispensável para o funcionamento celular. A partir dos valores de glicose presente no sangue é possível diagnosticar doenças relacionadas com o metabolismo dos hidratos de carbono e fazer a monitorização de muitas outras doenças, como por exemplo a diabetes mellitus.

A amostra de sangue das aves para análise deste parâmetro, é relativamente estável quando comparada com a dos mamíferos, isto porque para obterem energia, os

eritrócitos das aves dependem primariamente do metabolismo dos ácidos gordos e não da glicólise (Capitelli & Crosta, 2013; Hochleithner, 1994; Schmidt et al., 2007). Contudo, é necessário ter cuidado no manuseamento porque amostras armazenadas que se encontrem contaminadas por bactérias podem levar a medições artificialmente baixas dos níveis de glicose (Hochleithner, 1994).

Existem grandes variações entre espécies relativamente às concentrações de glicose no sangue. Aves saudáveis possuem concentrações de glicose no sangue maiores que 150 g/L (Harr, 2002). Normalmente os valores encontram-se entre 200 a 500 g/L (Thrall et al., 2004), podendo alcançar os 800 g/L em aves de porte pequeno como acontece nos beija-flores (Diamond et al., 1986).

Os níveis da glicose podem ser determinados por dois tipos de métodos, os enzimáticos e os colorimétricos (Hochleithner, 1994). Apesar deste último tipo de teste ter sido utilizado com sucesso em aves, os valores podem ser influenciados caso ocorra lipemia ou hemólise na amostra levando a valores sobrevalorizados (Bush, 1991).

No trabalho presente, o método utilizado acabou por ser enzimático e colorimétrico uma vez que estão envolvidas as enzimas glicose oxidase e peroxidase que catalisam a oxidação da glicose a ácido glicónico e a peróxido de hidrogénio, formando-se posteriormente um complexo de cor avermelhada (quinoneimina), cuja absorvância é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

Nas aves, os níveis de glicose no sangue são mantidos da mesma maneira que nos mamíferos, pela influência da insulina e do glucagon. A via primária para fornecer energia às células e manter os níveis de glicose estáveis é a conversão do glicogénio presente no fígado. Porém, em períodos de jejum, os níveis de glicose são repostos pela decomposição de gorduras e proteínas constituintes do músculo, ou então através da gliconeogénese no fígado e rins (Hochleithner, 1994).

Os níveis de glicose variam com a idade, sendo mais elevados em juvenis do que em adultos, possuem também variações circadianas e relacionadas com o stress (Hochleithner, 1994).

Pode ocorrer hiperglicemia em situações de esforço físico, stress, na presença de temperaturas extremas ou caso seja administrada medicação composta por glicocorticóides (Capitelli & Crosta, 2013). Diminuições nos níveis de glicose no plasma, ou hipoglicemia, podem estar relacionados com disfunções hepáticas em casos de infecções virais (Hochleithner, 1994), pela produção deficiente ou uso excessivo de glicose como no caso da aspergilose (Woerpel & Rosskopf, 1984) e também em situações em que exista má digestão e absorção do alimento (Capitelli & Crosta, 2013).

Fósforo (P)

O fósforo inorgânico é um dos principais constituintes dos ossos. Possui um papel importante no equilíbrio ácido-base e fundamental a nível celular, pois permite o armazenamento, liberação e transferência de energia. Este nutriente é proveniente exclusivamente da alimentação (Hochleithner, 1994).

Conjuntamente com o ALP, participam na ossificação e por isso os valores de fósforo inorgânico no sangue apresentam uma diminuição em função da idade (Alonso-Alvarez, 2005).

Em aves saudáveis, os valores de fósforo inorgânico normalmente oscilam entre 5 a 7 g/L (McCain, 2012; Thrall et al., 2004), sendo que a sua concentração é regulada maioritariamente pela excreção renal (Capitelli & Crosta, 2013).

O princípio da reação da deteção dos níveis de fósforo baseia-se na formação de um complexo de fosfomolibdato a partir de molibdato de amónia, ácido sulfúrico e fosfato. O aumento da absorvância é diretamente proporcional à concentração de fosfato.

Para que não existam interferências na medição do verdadeiro valor deste componente, é necessária atenção durante o manuseamento para evitar que ocorra hemólise porque a concentração de fosfato existente nos eritrócitos é maior do que no plasma, e porque a hemoglobina interfere na reação colorimétrica utilizada (Hochleithner, 1994).

Elevações dos níveis de fosfato inorgânico podem ser devidos a danos nos rins, excesso de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário e hipoparatiroidismo. Diminuições dos níveis de fosfato inorgânico no plasma acontecem mais raramente e podem ser devidas à deficiência de vitamina D, má absorção causada pela presença de agentes quelantes na dieta, e devido à utilização de glicocorticóides durante longos períodos de tempo (Hochleithner, 1994).

Cálcio (Ca)

O cálcio é um dos principais constituintes do osso e por esse mesmo motivo, é detentor de um papel fundamental na estrutura corporal dos animais. Contudo, também possui funções fisiológicas bastante importantes como a transmissão de impulsos nervos, a regulação da permeabilidade das membranas celulares, a ativação de sistemas enzimáticos, entre outros (Hochleithner, 1994).

Em amostras de plasma de sangue, o cálcio pode ser encontrado em três formas: livre, ligado a proteínas e quelado a aniões, como o fosfato e o citrato (Lumeij, 2008).

Os seus valores normais (exceto em fêmeas que se encontrem em postura) oscilam entre 8-11mg/dL (Capitelli & Crosta, 2013).

O método bioquímico para analisar a sua concentração baseia-se na combinação de iões de cálcio com Arsenazo III, produzindo um complexo azulado cuja absorvância é diretamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra. Para que não exista interferência.

Elevações nos níveis de cálcio podem estar relacionados com dietas cuja concentração de vitamina D é excessiva e desidratação. Por outro lado, podem existir diminuições nas concentrações de cálcio relacionadas com hipoparatiroidismo e em tratamento à base de glicocorticóides (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008).

Colesterol Total (TC)

O colesterol é um lípido bastante importante por ser precursor de todas as hormonas esteroides e ácidos biliares, e por fazer parte da constituição da membrana plasmática das células (Hochleithner, 1994).

As análises bioquímicas ao colesterol total incluem tanto o colesterol livre como os ésteres de colesterol (Hochleithner, 1994). Este método é enzimático e baseia-se na catálise do éster de colesterol gerando-se peróxido de hidrogénio que posteriormente vai oxidar a 4-Aminoantipirina com fenol formando-se um corante, a quinoneimina, cuja absorvância é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na amostra. Em algumas espécies da família dos Psittacidae, os valores de indivíduos saudáveis podem oscilar entre 100 a 250 mg/dL (Capitelli & Crosta, 2013) no entanto, existe pouca informação sobre o valor de diagnóstico deste composto em aves (Hochleithner, 1994).

Este composto é obtido na dieta através de proteínas de origem animal sendo que também pode ser sintetizado no fígado (Hochleithner, 1994) e é eliminado na forma de ácidos biliares (Capitelli & Crosta, 2013).

Os seus valores podem variar conforme a dieta (animais carnívoros irão apresentar valores mais elevados) (Harrison & Harrison, 1986) e com o género em algumas espécies (Hochleithner, 1994). Elevações dos seus níveis podem ser devidas à presença de hipotireoidismo, lesões no fígado, obstrução do ducto biliar, jejum prolongado e dietas ricas em gordura (Woerpel & Rosskopf, 1984). Relativamente à existência de valores mais baixos, estes podem ser explicados pela presença de danos no fígado, intoxicação alimentar por aflatoxinas (Woerpel & Rosskopf, 1984), dietas pobres em gordura, intoxicação por endotoxinas de *Escherichia coli* e infeção por espiroquetas (Hochleithner, 1994).

Ureia (UREA)

A ureia é produzida no fígado através do catabolismo de proteínas sendo posteriormente excretada nos rins pela filtração glomerular. Aqui, ela pode ser quase totalmente reabsorvida em casos de desidratação (Hochleithner, 1994).

O método para a determinação deste composto baseia-se na hidrólise da ureia a partir da urease, sendo assim um método indireto. O método direto está relacionado com as variações da reação da molécula de tiazida (Hochleithner, 1994).

Ainda é dada pouca significância à medição deste composto no plasma das aves por este se encontrar em pequenas quantidades. Todavia, poderá ser utilizado como um bom indicador do grau de desidratação de um indivíduo (Hochleithner, 1994).

É vantajoso avaliar simultaneamente os níveis de ureia e os de ácido úrico. A razão dos dois parâmetros permite diferenciar entre desidratação, efeitos pós-prandiais e patologias renais. Esta razão funciona também como um indicador da taxa de filtração glomerular (Harr, 2002; Lumeij & Overduin, 1990).

Ácido Úrico (UA)

O ácido úrico é sintetizado maioritariamente no fígado (Hochleithner, 1994) e em menores quantidades nos túbulos renais (Harr, 2002; Chou, 1972), onde também ocorre a sua excreção (Hochleithner, 1994).

A análise bioquímica a este parâmetro pode ser realizada a partir de plasma heparinizado (Hochleithner, 1994). Baseia-se no método urease-peroxidase no qual o ácido ascórbico é oxidado, eliminando assim a sua interferência, e onde o UA é catalisado para gerar peróxido de hidrogénio que vai posteriormente oxidar um composto formando-se assim a quinoneimina.

A medição de valores elevados do ácido úrico no sangue do grupo das aves é bastante usada para a deteção de doenças renais, apesar de existirem algumas espécies cujo rim consegue compensar o dano antes de se detetarem valores preocupantes (Hochleithner, 1994).

Existem influências fisiológicas nos valores de UA presentes no sangue. Por exemplo, aves juvenis possuem concentrações mais baixas que os adultos. Existem também evidências de um aumento da concentração de UA durante a atividade ovulatória. Este parâmetro também é influenciado pelo tipo de dieta, sendo que os carnívoros são os que possuem os valores mais elevados (Hochleithner, 1994). No período

imediatamente após a refeição, é normal que os níveis de ácido úrico se encontrem um pouco mais elevados (McCain, 2012).

Em casos de desidratação severa pode eventualmente ocorrer elevação dos valores de ácido úrico. Isto ocorre porque a circulação nos túbulos renais é reduzida, diminuindo desta forma a excreção deste composto (Lumeij, 2008).

1.4.3 Eletrólitos

Magnésio

O magnésio como macroelemento desempenha nas aves variadas funções desde a participação no metabolismo dos lípidos e dos hidratos de carbono, a participação no crescimento ósseo e nas transferências de energia e até nas atividades neuromusculares e nervosa.

Os seus níveis são medidos através de testes fotométricos. Os iões de magnésio formam um complexo com o reagente azul de xilidil de cor azulada, na presença de uma solução alcalina. Para isso é usado um agente quelante para eliminar a interferência do cálcio. O aumento da absorvância será então proporcional à concentração de magnésio.

1.5 Objetivos

O objetivo deste estudo recai sobre a análise da variação de determinados valores hematológicos e bioquímicos, de amostras de sangue recolhidas durante cada processo de reabilitação, de indivíduos de algumas espécies de aves marinhas admitidas no Centro.

Mais especificamente, foram avaliados indivíduos de espécies com características e hábitos distintos, foram analisados vários métodos de análise e finalmente foram discutidos os resultados que podem contribuir, quer na fase de diagnóstico, quer na fase de tratamento dos indivíduos, para o sucesso do processo de reabilitação e devolução ao Oceano.

Ao mesmo tempo, o presente estudo contribuirá para o aumento do conhecimento ao nível de análises sanguíneas em aves marinhas, cujo grupo ainda se encontra pouco estudado e com poucos ou quase nenhuns valores de referência para aves saudáveis.

1.6 Estrutura

Neste capítulo faz-se uma pequena introdução sobre aspetos importantes relacionados com a reabilitação de animais marinhos bem como a descrição dos objetivos do presente trabalho alvo desta dissertação. A descrição dos métodos utilizados apresenta-se no capítulo 2 e, no capítulo 3, descrevem-se os resultados obtidos. A discussão dos respetivos resultados encontra-se no capítulo 4 e por fim no capítulo 5 é possível encontrar uma síntese do trabalho efetuado, incluindo as principais conclusões do mesmo. No capítulo 6 encontram-se todas as referências bibliográficas utilizadas para a realização do presente trabalho.

CAPÍTULO 2 – MÉTODOS

2.1 Procedimentos de admissão e diagnóstico

Dada a entrada de um animal marinho no CRAM, é necessário realizar um conjunto de procedimentos para perceber qual o problema que este apresenta e que será identificado como a causa de entrada. A partir desta avaliação, é possível iniciar o processo de reabilitação.

Inicialmente é realizado um exame físico detalhado que compreende a avaliação da postura do animal, a existência de feridas, corpos estranhos, hemorragias externas e internas, avaliação do estado da plumagem, entre outros. Após este exame é necessário estabilizar o animal para corrigir alguns problemas prioritários como a dispneia, hemorragias, hipertermia, hipotermia e desidratação. Só após a estabilização do animal e sempre que possível, são realizados exames complementares, como a radiografia, a endoscopia ou ecografia se necessário, recolha de sangue (alvo de estudo deste trabalho) e análise às fezes. Segue-se então o período de reabilitação durante o qual os animais são sujeitos aos tratamentos que necessitam, devendo ser observados e pesados regularmente.

2.2 Recolha e processamento das amostras de sangue

A recolha de amostras realizou-se entre setembro 2017 e setembro de 2018, e no total foram obtidas 64 amostras para as seis espécies em estudo.

A colheita de sangue em aves pode ser realizada em várias zonas. Normalmente, utiliza-se a asa (veia ulnar), a pata (veia metatarsal) (Fig.7) ou em casos mais raros, o pescoço (veia jugular). Existem também outros locais de acesso para a recolha de sangue como por exemplo a unha. A escolha do local apropriado irá depender da espécie, do volume necessário, do método de contenção e claro da experiência do operador (Clark et al., 2009). Para que seja seguro retirar sangue, o volume da amostra não deve ultrapassar 1% do peso corporal do animal ou 10% do

volume total de sangue que se encontra em circulação (Clark et al., 2009), a menos que se apresente bastante debilitado. Neste caso, apenas se deve retirar a quantidade mínima extremamente necessária para a realização das análises (Lumeij, 2008).



Figura 7 – Recolha de sangue na pata de uma gaivota, com o auxílio de um cateter.

No presente estudo foram utilizadas duas maneiras distintas para a colheita de sangue: junção de agulha e de uma seringa ou com a utilização de um cateter (Fig. 7). O tamanho da agulha depende do tamanho do animal (Campbell, 1994). Parte da amostra é utilizada no EPOC para a obtenção de valores bioquímicos quase imediatos enquanto que outra parte é utilizada nos tubos capilares de vidro para determinação manual do hematócrito e das proteínas totais. A amostra restante é colocada num tubo heparinizado para centrifugação durante 10 min a 4500 rpm. O sobrenadante é retirado utilizando uma pipeta automática e passado para um “eppendorf” (devidamente assinalado com o nome da espécie, número do indivíduo e data de recolha) e guardado posteriormente na arca de congelação à temperatura de -20°C para serem realizadas *à posteriori* as análises bioquímicas.

Logo após à colheita do sangue procede-se à realização do esfregaço que, depois de seco, é submetido à coloração *Diff-Quick* formada por um fixador e dois corantes (referido na secção das análises hematológicas).

2.3 Determinação do hematócrito e proteínas totais

Os tubos capilares de vidro referidos na secção anterior (recolha e processamento da amostra de sangue) são analisados no laboratório para a determinação do hematócrito e proteínas totais. Em poucos minutos permite perceber se o animal se encontra desidratado, por exemplo.

Sempre que possível foram utilizados dois tubos capilares de vidro, resultando num valor médio obtido a partir dos valores de cada microtubo. Os tubos capilares de vidro são centrifugados durante 10 min a 4500 rpm para separação dos componentes sanguíneos. Mede-se manualmente o comprimento total (CT) e o comprimento ocupado pelos eritrócitos (CE) (Fig. 8), sendo desta maneira possível obter o valor do hematócrito em percentagem. Em indivíduos saudáveis, esta percentagem varia entre 35-55 % (Campbell, 2012).

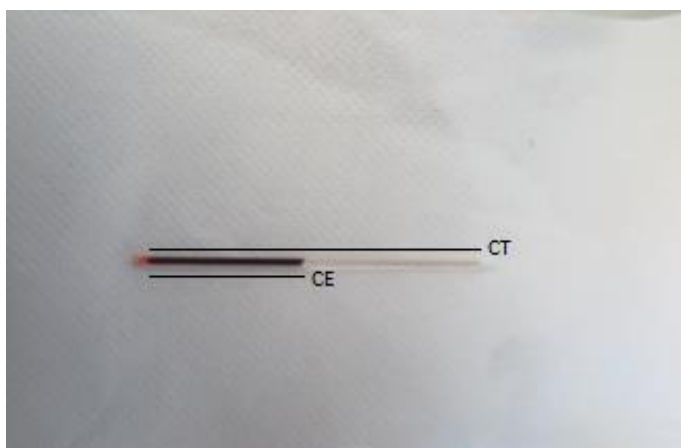


Figura 8 – Tubo capilar de vidro após centrifugação. CT- comprimento total; CE – comprimento eritrócitos.

Relativamente às proteínas totais, utilizou-se o plasma dos tubos capilares de vidro, que foi colocado no refratómetro, fazendo-se a sua medição na escala observável. A concentração das proteínas plasmáticas varia entre 3,5 - 6 g/dL, em indivíduos saudáveis (Newman et al., 2000).

2.4 Observação ao microscópio

Os esfregaços de sangue, após a secagem da coloração *Diff-Quick*, foram observados no microscópio ótico para identificação de possíveis anomalias celulares e para a contagem diferencial de leucócitos (Fig. 9). Esta contagem foi realizada na zona da monocamada celular presente no esfregaço de sangue, utilizando a objetiva 100x com óleo de imersão. Foram contados e classificados 100 leucócitos em campos adjacentes (Campbell, 2015).

As anomalias observadas relacionam-se com a morfologia dos eritrócitos. Para isso, tomou-se especial atenção à presença de parasitas e a variações de tamanho e forma (Mitchell & Johns, 2008).

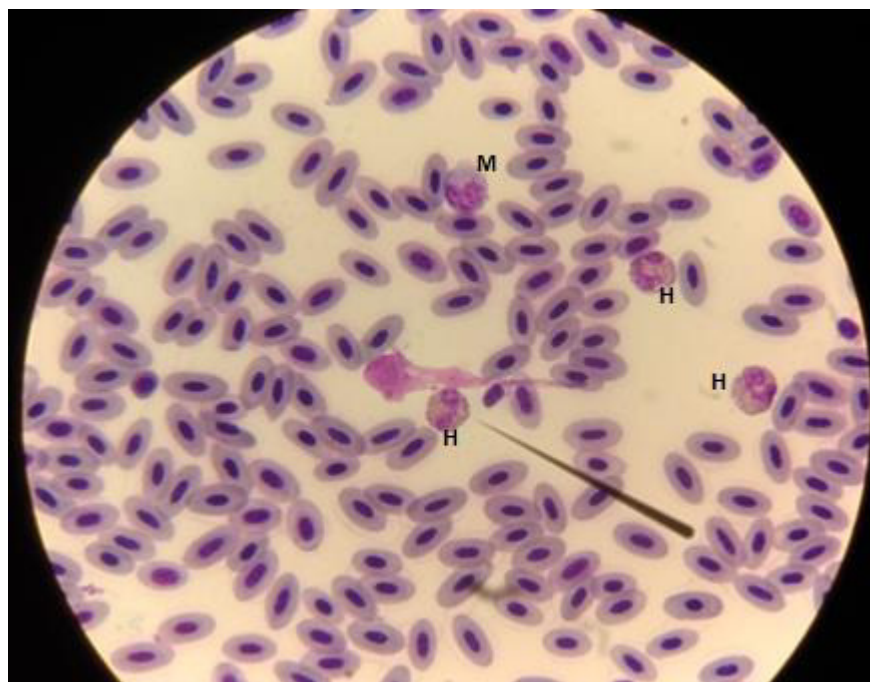


Figura 9 – Observação ao microscópio ótico (100x) de um esfregaço de sangue de um indivíduo da espécie *L. michahellis*, com utilização da coloração *Diff-Quick*. É possível observar três heterófilos (H) e um monócito (M).

2.5 MindRay

As análises bioquímicas foram efetuadas no analisador Mindray BS-120. Como muitas vezes o volume total de amostra (neste caso soro sanguíneo) não foi suficiente para a realização do perfil bioquímico completo, foi dada prioridade a alguns parâmetros (Harr, 2002), sendo que foi efetuada uma diluição de 1:1. As análises bioquímicas efetuadas foram: a Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase, Fosfatase Alcalina, Creatina Quinase, Gama Glutamilttransferase, Lactato desidrogenase, Albumina, Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total, Creatinina, Ferro, Globulina, Glucose, Fósforo, Colesterol Total, Proteínas Totais, Ureia e Magnésio.

2.6 Tratamento de dados

Inicialmente foi realizada a estatística descritiva do conjunto de dados obtidos durante o presente trabalho, tendo em conta os vários métodos utilizados, as várias espécies amostradas e as principais causas de entrada. Seguiu-se uma análise de componentes principais (ACP), realizada no programa PAST v.2.12, para detetar quais as causas de entrada mais importantes e que melhor explicavam a variabilidade dos dados obtidos, tendo também sido possível verificar quais os parâmetros bioquímicos mais associados a essas causas de entrada.

As variações dos valores dos parâmetros considerados mais importantes, foram depois analisadas através de ANOVA (nos casos em que o conjunto de dados cumpria os pressupostos do teste) seguida do teste de Tukey e restantes parâmetros foram analisados através de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste “post-hoc” de Dunn, ambas as análises realizadas no software PRISM 7.

Para as comparações entre cada parâmetro bioquímico para as espécies *Larus michahellis* e *Morus bassanus* cuja causa de entrada foi o trauma, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com o auxílio do software PRISM.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

Considerando as amostras que foram analisadas, salienta-se que há bastante discrepância entre o número de amostras obtidas para duas espécies (*Larus michahellis* e *Morus bassanus*) para as quais foi possível obter o maior número de amostras. Esta discrepância deverá ser tomada em conta na interpretação dos resultados, pretendendo este trabalho representar uma contribuição para um estudo mais abrangente, a realizar no futuro quando for possível reunir um número mais representativo de amostras das várias espécies avaliadas.

Neste estudo foi possível utilizar vários métodos diferentes (ver secção dos métodos) para estimar alguns dos parâmetros mais urgentes a avaliar, assim que se dá entrada a um animal resgatado.

Um destes parâmetros é o valor de proteínas totais. Os valores obtidos pelos dois métodos utilizados neste caso (MindRay e Refractómetro), apresentam-se na tabela 3.

Tabela 3 – Comparação entre dois métodos de análise para a concentração das Proteínas Totais. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

PROTEÍNAS TOTAIS						
	n	Mindray (g/dL)			Refractómetro (g/dL)	
		Média ± DP (min-max)	Mediana		Média ± DP (min-max)	Mediana
<i>Larus michahellis</i>	21	4,17 ± 0,97 (2,15-6,89)	4,12	18	5,27 ± 1,29 (3,6-8)	5
<i>Larus fuscus</i>	8	3,76 ± 0,91 (1,87-4,89)	3,9	7	5,1 ± 1,27 (3,6-7)	4,6
<i>Morus bassanus</i>	19	4,24 ± 1,31 (2,1-7,6)	4,23	15	4,51 ± 1,18 (3-7,4)	4,3
<i>Fulmarus glacialis</i>	4	5,33 ± 1,98 (3,51-7,46)	5,18	4	4,76 ± 0,43 (4,4-5,4)	4,65
<i>Uria aalge</i>	4	3,6 ± 1,41 (1,51-4,53)	4,17	4	4,33 ± 2,13 (1,2-6)	5,05

Outro dos parâmetros comparados, é o valor concentração da CREA e os valores obtidos pelos dois métodos utilizados (MindRay e EPOC) apresentam-se na tabela 4. Os mesmos 2 métodos permitiram também obter valores para a concentração da Glucose (tabela 5) e Cálcio (tabela 6).

Tabela 4 – Comparação entre dois métodos de análise para a concentração da Creatinina. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

CREATININA						
	Mindray (mg/dL)			EPOC (mg/dL)		
	n	Média ± DP (min-max)	Mediana	n	Média ± DP (min-max)	Mediana
<i>Larus michahellis</i>	19	0,93 ± 0,11 (0,74-1,2)	0,94	*	- (0,3-2,66)	-
<i>Larus fuscus</i>	8	0,82 ± 0,14 (0,55-0,96)	0,88	3	0,6 ± 0,41 (0,3-1,07)	0,43
<i>Morus bassanus</i>	18	0,91 ± 0,18 (0,42-1,12)	0,95	3	1,29 ± 0,45 (0,78-1,62)	1,47
<i>Uria aalge</i>	*	- (1,04-1,2)	-	3	2,35 ± 0,17 (2,18-2,51)	2,36

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Tabela 5 - Comparação entre dois métodos de análise para a concentração da Glucose. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

GLUCOSE						
	Mindray (mg/dL)			EPOC (mg/dL)		
	n	Média ± DP (min-max)	Mediana	n	Média ± DP (min-max)	Mediana
<i>Larus michahellis</i>	14	325,93 ± 61,66 (244-492)	308,5	*	- (166-324)	-
<i>Larus fuscus</i>	6	321,83 ± 46,48 (253-378)	329	3	254,67 ± 18,45 (239-275)	250
<i>Morus bassanus</i>	16	253,81 ± 41,08 (178-316)	255,5	4	217,75 ± 48,51 (145-243)	241,5
<i>Uria aalge</i>	4	260,5 ± 38,54 (212-304)	263	3	235 ± 17,00 (218-252)	235

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Tabela 6 - Comparação entre dois métodos de análise para a concentração de Cálcio. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

CÁLCIO						
	Mindray (mg/dL)				EPOC (mg/dL)	
	n	Média ± DP (min-max)	Mediana	n	Média ± DP (min-max)	Mediana
<i>Larus michahellis</i>	15	9,59 ± 1,13 (7,2-12,2)	9,4	*	- (4,56-5,12)	
<i>Larus fuscus</i>	8	9,25 ± 2,22 (4,6-11,8)	9,1	3	5,13 ± 0,23 (4,96-5,4)	5,04
<i>Morus bassanus</i>	18	9,33 ± 1,06 (7,3-12)	9,2	4	5,37 ± 0,25 (5,12-5,6)	5,38
<i>Uria aalge</i>	3	9,73 ± 2,58 (7,6-12,6)	9	3	4,68 ± 0,26 (4,44-4,96)	4,64

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

No caso da percentagem de hematócrito, os valores foram obtidos manualmente e através do equipamento EPOC (tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre dois métodos de análise para a percentagem de Hematócrito. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

HEMATÓCRITO						
	Manual (%)				EPOC (%)	
	n	Média ± DP (min-max)	Mediana	n	Média ± DP (min-max)	Mediana
<i>Larus michahellis</i>	18	43,27 ± 9,44 (20,6-52,7)	46,83	*	- (31-42)	
<i>Larus fuscus</i>	7	49,01 ± 5,97 (39,4-56)	48,9	3	28,67 ± 5,86 (22-33)	31
<i>Morus bassanus</i>	15	39,97 ± 10,28 (20-50,7)	44	3	30,33 ± 8,14 (21-36)	34
<i>Uria aalge</i>	4	45,05 ± 6,52 (36,2-51,7)	46,15	3	32 ± 8,54 (23-40)	33

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Utilizando o MindRay, foi ainda possível obter simultaneamente uma série de valores para variados parâmetros (ver tabela 8), comparar os níveis de proteínas (ver tabela 9) com os valores obtidos pelo Refractómetro e obter parâmetros via EPOC para a espécie *Larus michahellis*. No caso da espécie *M. bassanus*, utilizando o MindRay, foi também possível obter simultaneamente uma série de valores para variados parâmetros (ver tabela 10), comparar os níveis de proteínas (ver tabela 11) com os valores obtidos pelo Refractómetro e obter parâmetros via EPOC.

Sempre que possível, os valores apresentam-se tendo em conta as principais causas identificadas de entrada dos animais analisados (traumatismo, doença e petroleamento).

A análise hematológica das amostras dos indivíduos da espécie *L. michahellis*, *L. fuscus* e *M. bassanus* apresentam-se nas tabelas 12 e 13.

Tabela 8 – Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no Mindray da espécie *L. michahellis*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

<i>Larus michahellis</i>									
	TRAUMATISMO				DOENÇA				OLEADO*
	Parâmetros (unidade)	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana (min-max)
Mindray	Globulina (g/dL)	7	2,86 ± 0,62	1,96-3,98	2,86	6	3,12 ± 1,56	2,3-5,36	2,74 2,98-3,5
	Alb/Glo	7	0,41 ± 0,24	0,1-0,88	0,39	6	0,45 ± 0,18	0,35-0,58	0,45 0,28-0,56
	UREA (mg/dL)	8	17,73 ± 11,64	10-46	15,4	6	16,03 ± 7,34	8,1-19,8	17,9 13,4-32,6
	ALP (U/L)	6	85,17 ± 34,34	46-129	85,5	6	91,83 ± 47,06	45-144	89 66-176
	TP (g/dL)	9	3,99 ± 0,82	2,152-5,132	4,12	7	4,34 ± 1,89	3,1-6,89	3,97 3,802-4,494
	ALB (g/dL)	7	1,02 ± 0,37	0,2-1,258	1,15	6	1,19 ± 0,5	0,81-1,53	1,22 0,83-0,996
	GGT (U/L)	7	7,29 ± 2,87	4-12	6	6	7,17 ± 4,18	2-12	6,5 6-22
	AST (U/L)	7	454,9 ± 395,84	115,2-1048,9	276,6	6	646,03 ± 470,2	135,2-1410,4	643,7 408-679,4
	ALT (U/L)	7	114,67 ± 49,12	30,8-162,4	111,4	6	123,7 ± 77,11	45,9-218,8	131,15 134,4-141,2
	CREA (mg/dL)	8	0,92 ± 0,07	0,77-1	0,94	6	0,96 ± 0,4	0,74-1,2	0,96 0,88-0,92
	GLU (mg/dL)	4	290 ± 7,62	282-297	290,5	6	356,83 ± 149,28	300-492	334
	P (mg/dL)	6	4,29 ± 0,98	2,68-5,61	4,41	5	3,44 ± 1,66	2,04-4,46	3,42
	CK (U/L)	6	2049,47 ± 2033,32	229,4-5021,8	1617,7	6	1196,23 ± 884,68	242,8-2470	1265,15
	CA (mg/dL)	6	9,28 ± 1,12	7,2-10,4	9,5	5	9,84 ± 4,22	8,8-12,2	9,2 9-10,8
	UA (mg/dL)	6	8,33 ± 1,65	5,7-10,6	8,4	7	11,33 ± 6,36	3,2-18,8	12,2
	MG (mg/dL)	4	2,25 ± 0,5	2-3	2				
	LDH (U/L)	7	318,3 ± 287,13	126,8-932,8	188	6	206,03 ± 125,88	89,8-324,2	190,35 219,2-249,2
	TC (mg/dL)	8	304,88 ± 122,4	114-466	298,5	6	369 ± 211,07	162-576	404,5 332-360
	Bil-T (μmol/L)	*		58,87-83,78		5	201,01 ± 155,14	62,94-409,94	197,34
	Bil-D (μmol/L)	4	27,25 ± 13,35	16-44	24,5	4	16,75 ± 8,65	10-21	18

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Tabela 9 - Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no EPOC, no Refractómetro e medição manual da concentração do hematócrito, da espécie *L. michahellis*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

<i>Larus michahellis</i>										
TRAUMATISMO						DOENÇA				OLEADO*
	Parâmetros (unidade)	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	(min-max)
Medição manual	Hct (%)	7	43,5 ± 7,5	30,8-51,0	46,2	7	42,4 ± 19,2	20,6-52,7	50,0	50,0-52,0
	Refractómetro									
	Pt (g/dL)	7	4,8 ± 0,8	3,8-6,1	4,8	7	5,1 ± 2,3	3,6-8,0	4,6	5,8-6,6
EPOC*	pH			7,364-7,373						
	pCO ₂ (mmHg)			32,7-71,7						
	pO ₂ (mmHg)			36,2-49,7						
	cHCO ₃ ⁻ (mmol/L)			19-39,3						
	cSO ₂ (%)			63-84,3						
	Na ⁺ (mmol/L)			151-154						
	K ⁺ (mmol/L)			3,1-3,3						
	Ca ⁺⁺ (mmol/L)			1,14-1,28						
	Cl ⁻ (mmol/L)			105-119						
	cTCO ₂ (mmol/L)			20-41,5						
	Hct (%)			31-42						
	cHGB (g/dL)			10,6-14,2						
	Glu (mg/dL)			166-324						
	Lac (mmol/L)			4,41-9,93						

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Tabela 10 - Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no Mindray da espécie *M.bassanus*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

Morus bassanus							
TRAUMATISMO					DOENÇA*		OLEADO*
Mindray	Parâmetros (unidade)	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	(min-max)	(min-max)
	Globulina (g/dL)	15	3,31 ± 0,92	1,9-5,46	3,37	1,57-3,14	4,07-4,38
	Alb/Glo	15	0,37 ± 0,19	0,2-0,78	0,31	0,34-0,35	
	UREA (mg/dL)	13	47,35 ± 38,51	12-134,5	36,8	10,1-148,5	
	ALP (U/L)	15	165,47 ± 104,56	30-354	182	180-389	
	TP (g/dL)	15	4,39 ± 1,36	2,493-7,596	4,27	2,1-4,234	
	ALB (g/dL)	15	1,07 ± 0,52	0,458-2,22	0,9	0,533-1,094	
	GGT (U/L)	11	6 ± 3,35	3-12	5		
	AST (U/L)	15	717,13 ± 609,46	205,4-2192,7	511	263,2-471,7	
	ALT (U/L)	14	57,81 ± 53,04	9,7-220,6	44,35	35,9-73,4	
	CREA (mg/dL)	15	0,89 ± 0,19	0,42-1,12	0,94	0,92-1,03	
	GLU (mg/dL)	14	251,43 ± 43,37	178-316	250		
	P (mg/dL)	13	4,97 ± 1,7	2,54-8,34	4,63	3,42-5,82	
	CK (U/L)	12	1910,39 ± 1018,29	93,2-3448,4	1686,5	1370,3-1890,3	
	CA (mg/dL)	15	9,31 ± 1,16	7,3-12	9	9-9,9	
	UA (mg/dL)	14	14,64 ± 6,82	5,2-26,8	13,5	25,1-28,8	
	MG (mg/dL)	11	2,18 ± 0,6	2-4	2	2-4	
	LDH (U/L)	15	526,73 ± 540,97	97,8-2071,6	282	256,1-298,6	
	TC (mg/dL)	15	160,4 ± 59,56	25-246	156	207-210	
	FE (µmol/L)	*		1,09-16,07			
	Bil-T (µmol/L)	11	388,37± 589,37	29,68-1721,14	149,86	213,12-1224,62	
Bil-D (µmol/L)	8	115,25 ± 184,78	13-564	46	60-492		

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores

Tabela 11 - Comparação entre as várias causas de entrada, para análises realizadas no EPOC, no Refractómetro e medição manual da concentração de proteínas, da espécie *M. bassanus*. DP desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

TRAUMATISMO						DOENÇA*	OLEADO*
	Parâmetros (unidade)	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	(min-max)	(min-max)
Medição manual	Hct (%)	11	38,05 ± 11,07	20-50,7	41,5	37-49,1	45-49,8
Refractómetro	Pt (g/dL)	11	4,62 ± 1,37	3-7,4	4,4	3,8-4,1	4,3-4,6
EPOC*	pH	3	7,18 ± 0,14	7,074-7,336	7,12		
	pCO ₂ (mmHg)	3	55,73 ± 7,67	47,4-62,5	57,3		
	pO ₂ (mmHg)	3	46,83 ± 12,19	37,8-60,7	42		
	cHCO ₃ ⁻ (mmol/L)	3	20,8 ± 3,91	18,3-25,3	18,8		
	cSO ₂ (%)	*		50-89			
	Na ⁺ (mmol/L)	*		154-160			
	K ⁺ (mmol/L)	3	5,2 ± 0,66	4,5-5,8	5,3		
	Ca ⁺⁺ (mmol/L)	3	1,36 ± 0,07	1,28-1,4	1,39		
	Cl ⁻ (mmol/L)	3	121 ± 7,94	115-130	118		
	cTCO ₂ (mmol/L)	3	22,53 ± 3,7	20,2-26,8	20,6		
	Hct (%)	*		21-36			
	cHGB (g/dL)	*		7-12,1			
	Glu (mg/dL)	3	209,33 ± 55,72	145-242	241		
	Lac (mmol/L)	3	8,01 ± 2,51	6,3-10,89	6,84		
	Crea	*		0,78-1,47			

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Tabela 12 – Análise hematológica a indivíduos da espécie *L. michahellis* e *L. fuscus*. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos.

<i>L. michahellis</i>										<i>L. fuscus</i>
Traumatismo					Doença				Oleado*	Traumatismo*
Parâmetros (unidade)	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana	(min-max)	(min-max)
Heterófilos	3	53 ± 6,56	47-60	52	5	43,2 ± 15,32	25-60	50	41-42	66-57
Eosinófilos	3	14,33 ± 8,5	8-24	11	5	20 ± 5,48	12-26	20	15-25	26-21
Basófilos	3	4 ± 2	2-6	4	5	3,4 ± 4,1	0-10	3	1-5	0-3
Linfócitos	3	23,67 ± 10,69	12-33	26	5	26 ± 7,84	19-35	22	24-35	4-13
Monócitos	3	5 ± 1	4-6	5	5	7,4 ± 2,79	5-12	6	3-9	4-6
TWBC/μL	3	27266,3 ± 14877,01	12250-42000	27548,89	5	38295,06 ± 24858,37	13169,72-65877,78	30741,67	16625-27300	36750-72391,67

* Existem poucas amostras, apenas é mostrado o intervalo de valores.

Tabela 13 – Análise hematológica a indivíduos da espécie *M. bassanus*. DP, desvio padrão; min-max, valores mínimos e máximos

<i>M. bassanus</i>				
Traumatismo				
Parâmetros (unidade)	n	Média ± DP	(min-max)	Mediana
Heterófilos	8	40,38 ± 17,62	15-69	37
Eosinófilos	8	24,38 ± 6,99	10-35	26
Basófilos	8	5,38 ± 3,54	0-10	5
Linfócitos	8	15,88 ± 10,66	4-31	16,5
Monócitos	8	14 ± 7,73	6-28	12
TWBC/μL	8	30549,9 ± 18369,74	4666,67-63087,5	26687,5

A análise exploratória da ACP (Fig. 10) permitiu identificar os parâmetros mais relevantes de acordo com a causa de admissão de aves no CRAM, havendo para isso uma separação entre os animais admitidos por trauma, doença ou oleados.

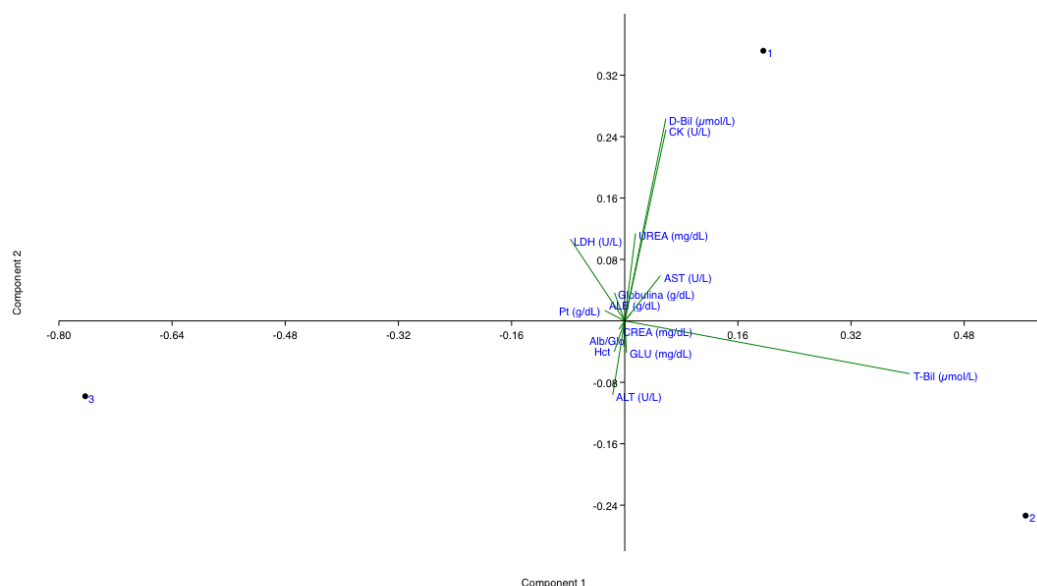


Figura 10 – Eixos 1 e 2 da ACP das variáveis sanguíneas analisadas.

Tabela 14 – Valores das componentes por causa de entrada.

PC	Eixo 1	Eixo 2	
1	0,19593	0,35178	O trauma é mais explicado pelo eixo 2 (componente positiva)
2	0,56685	-0,25365	A doença é mais explicada pelo eixo 1 (componente positiva)
3	-0,76278	-0,098135	Os oleados são mais explicados pelo eixo 1 (componente negativa)

Após a realização da análise exploratória de ACP, verificou-se que as várias causas de entrada são explicadas por eixos diferentes (Tabela 14). Verificou-se também que nas aves ingressadas, existe potencialmente alterações em relação a alguns parâmetros.

O metabolito Bil-D e as enzimas CK e AST, apresentam-se aumentados quando a causa de entrada é o trauma (Fig. 11). Existe incremento do Hct e da enzima ALT

associado a animais oleados (Fig. 11) e decréscimo em animais cuja causa de entrada é o trauma (Fig. 12).

O metabolito Bil-T encontra-se aumentado em animais cuja admissão é a doença (Fig. 11). Por fim, na enzima LDH e nos metabolitos UREA e Pt existe incremento associado a animais oleados (Fig. 11) e decréscimo em animais doentes (Fig. 11).

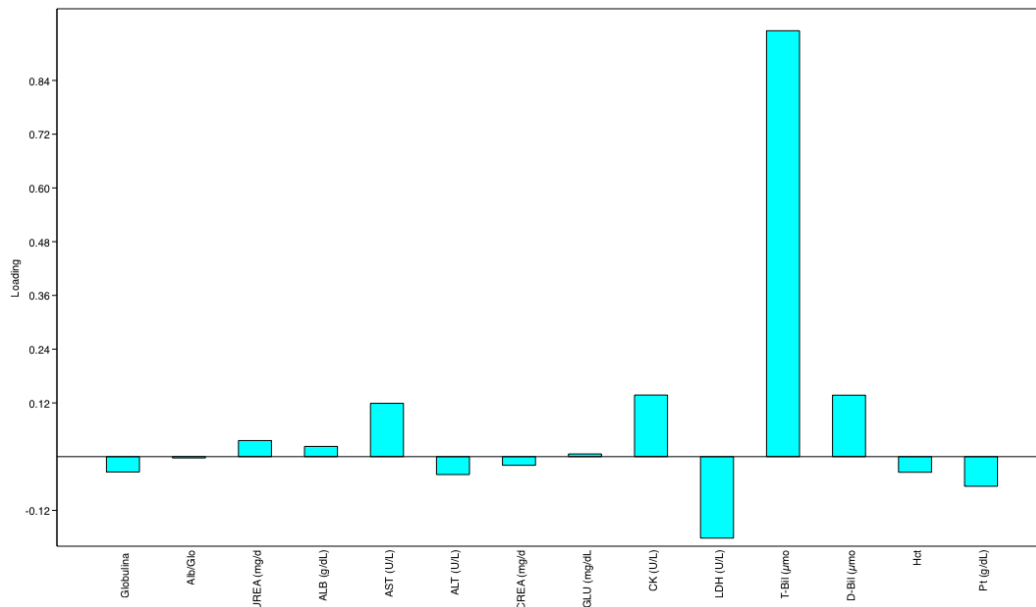


Figura 11 – Gráfico das variáveis explicativas do eixo 1.

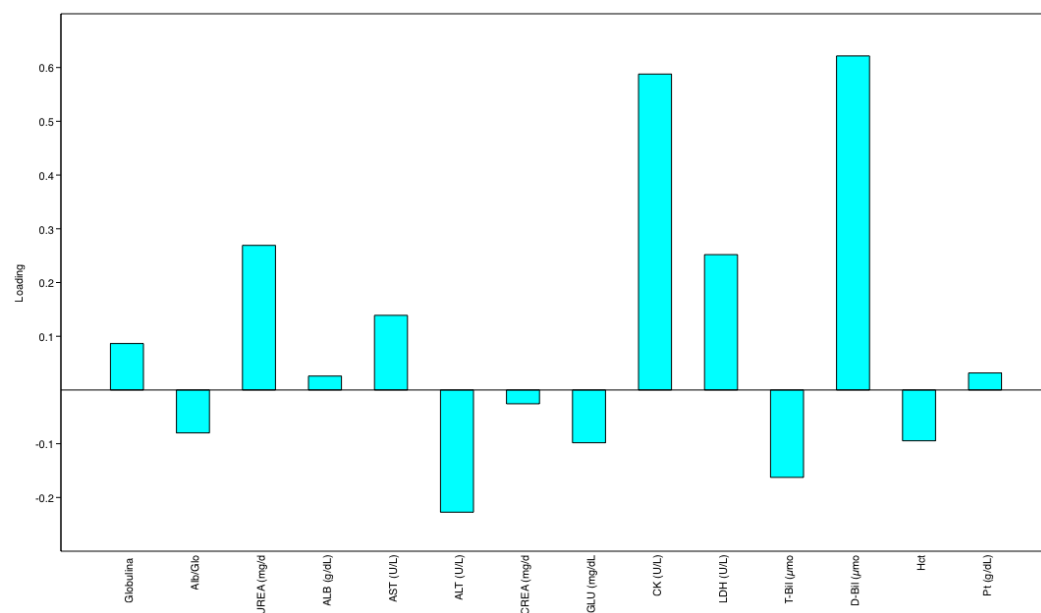


Figura 12 – Gráfico das variáveis explicativas do eixo 2.

Os nove parâmetros mais relevantes foram posteriormente submetidos a testes de ANOVA. No caso das análises aos parâmetros CK, Hct e Pt foi possível efetuar ANOVAs paramétricas porque os dados apresentavam uma distribuição normal (Tabela 15). Por não cumprirem os requisitos de distribuição normal (mesmo após transformação) nos casos dos parâmetros UREA, AST, ALT, LDH, Bil-T e Bil-D, as análises foram efetuadas com base em ANOVAs não paramétricas (teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 16).

Tabela 15 - Resultados das ANOVAs para os respectivos parâmetros (em todos os animais).

Parâmetro	F (GL)	p	Interpretação e comparações entre pares (Teste “post-hoc” de Tukey)
CK	3,884 (2,36)	<0,05	Incremento de CK nas aves com trauma, sendo mais baixa nas doenças e ainda mais baixa nos oleados. Trauma difere significativamente das doenças e oleados ($p<0,05$).
Hct	3,593 (2,33)	<0,05	Valores mais elevados nas aves oleadas e mais reduzido no trauma. Doenças apresentam valores intermédios. Trauma difere significativamente dos oleados ($p<0,05$). Não existem diferenças significativas entre as restantes causas de entrada ($p>0,05$).
Pt	3,602 (2,33)	<0,05	Valores mais elevados nas aves oleadas e mais reduzido nas aves com doenças. Trauma apresenta valores intermédios. Doença difere significativamente dos oleados ($p<0,05$). Não existem diferenças significativas entre as restantes causas de entrada ($p>0,05$).

Tabela 16 – Resultado das ANOVAs não paramétricas para os respetivos parâmetros.

Parâmetro	H	p	Interpretação e comparações entre pares (Teste “post-hoc” de Dunn)
UREA	6,061	<0,05	Incremento de ureia nos oleados e mais reduzida em aves doentes. Valores intermédios nas aves com traumas. Doença difere significativamente dos oleados ($P<0,05$). Nas restantes causas de entrada não há diferenças significativas entre si ($p>0,05$).
AST	0,274	>0,05	Ligeiramente mais elevada no trauma, mas sem diferenças significativas entre causas de entrada
ALT	2,707	>0,05	Ligeiramente mais elevada nos oleados e mais reduzida nos traumas, mas sem diferenças significativas entre causas de entrada.
LDH	1,296	>0,05	Ligeiramente mais elevada nos oleados e mais reduzida nas doenças, mas sem diferenças significativas entre causas de entrada.
Bil - T	2,561	>0,05	Ligeiramente mais elevada no trauma e valores similares entre trauma e oleados, mas sem diferenças significativas entre causas de entrada.
Bil - D	7,037	<0,05	Incremento nas aves com trauma e valores mais reduzidos em aves com doença e oleados Trauma difere significativamente das doenças e oleados ($P<0,05$). Não existem diferenças significativas entre doença e oleados ($p>0,05$).

Realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, para comparar cada parâmetro bioquímico entre as espécies Ganso-Patola e Gaivota-de-Patas-Amarelas.

Tabela 17 – Teste não paramétrico (Mann-Whitney) para a enzima ALT para as espécies *L.michahellis* e *M.bassanus*.

Parâmetro	U	p
ALT	17	< 0,05

Comparando cada parâmetro individualmente entre indivíduos cuja causa de entrada foi o trauma, das espécies *M. bassanus* e *L. michahellis*, verificou-se que a enzima ALT, medida no Mindray, é o único parâmetro que varia significativamente ($p < 0,05$) (tabela 17). Esta enzima possui valores muito mais elevados nos indivíduos da espécie *L. michahellis*.

De seguida, apresentam-se dois casos clínicos com características bastantes diferentes e que demonstram bem as dificuldades encontradas ao nível de diagnóstico e tratamento de aves marinhas

CASO CLÍNICO 1

No dia 13 de dezembro de 2017, deu entrada no CRAM um indivíduo adulto da espécie *F. glacialis*. Este animal foi encontrado na praia em Peniche, após a ocorrência de uma tempestade com ventos fortes e intensa precipitação.

Após a realização de um exame físico detalhado, verificou-se que o animal se encontrava exausto, com perda moderada de peso, hipovolémico e apresentando mucosas pálidas. Pare além disso, também se encontrava desidratado e com a ponta do bico partida. Contudo, estava ativo e bastante reativo a estímulos.

Inicialmente, o indivíduo começou por tomar um suplemento vitamínico e mineral (Aquaminivit) e Itraconazol, como medida preventiva de aspergilose. Passado quase um mês, iniciou a toma de antibióticos de largo espectro (Amoxicilina/Ácido Clavulânico e Enrofloxacina) utilizados no protocolo de reabilitação do fulmar na Califórnia (Bellizzi & Duerr, 2013) e como forma de melhorar o seu estado geral. Procedeu-se ao fornecimento de antibióticos depois de se observar falta de apetite e alguma apatia no indivíduo, e após análises, verificou-se que estava desidratado.

A alimentação foi composta por capelins (*Mallotus villosus*), que eram fornecidos na quantidade estimada e doseada para que o indivíduo atingisse o peso adequado.

Nas primeiras análises realizadas ao sangue, verificou-se que o nível de proteínas se encontrava bastante reduzido (Fig.13). Contudo, à medida que o indivíduo recuperava, os valores aproximaram-se da normalidade. É de salientar a diferença existente entre os valores obtidos através das análises efetuadas no Mindray e as análises realizadas manualmente utilizando os tubos capilares de vidro. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de o plasma das amostras de sangue conter Fibrinogénio podendo interferir na leitura da concentração de proteínas totais (Samour et al., 2016) realizada pelo Mindray. Contudo, não é compreensível a razão a pela qual, a partir do dia 35, os valores medidos pelo Mindray se elevam bastante, ultrapassando os valores medidos pelo Refractómetro.

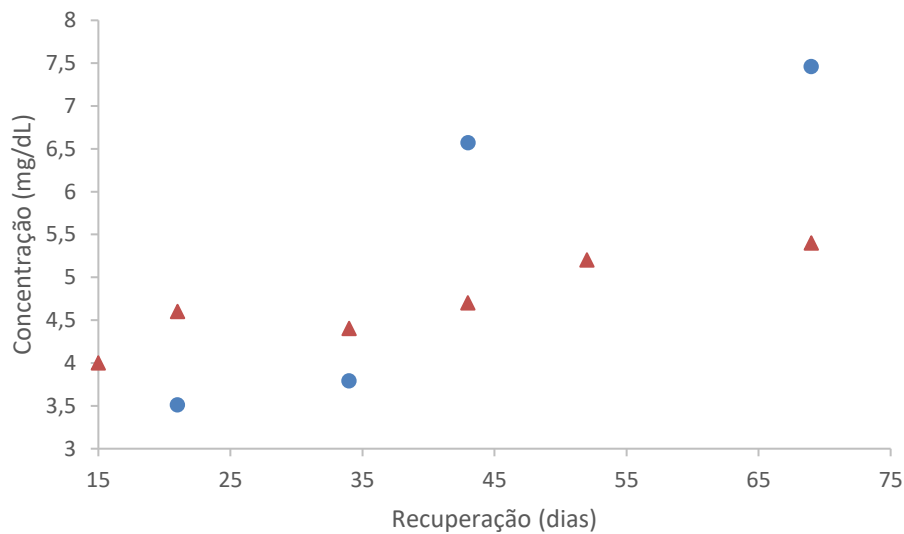


Figura 73- Evolução da concentração das proteínas totais (mg/dL), de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação. Comparação entre dois métodos: mindray (pontos azuis) e manual (triângulos vermelhos).

Após 1 dia de recuperação, o hematócrito estava severamente reduzido. Todavia, foi melhorando e apesar de ter sofrido uma diminuição por volta 35º dia, aumentou novamente atingindo valores considerados normais para um indivíduo saudável (Fig. 14).

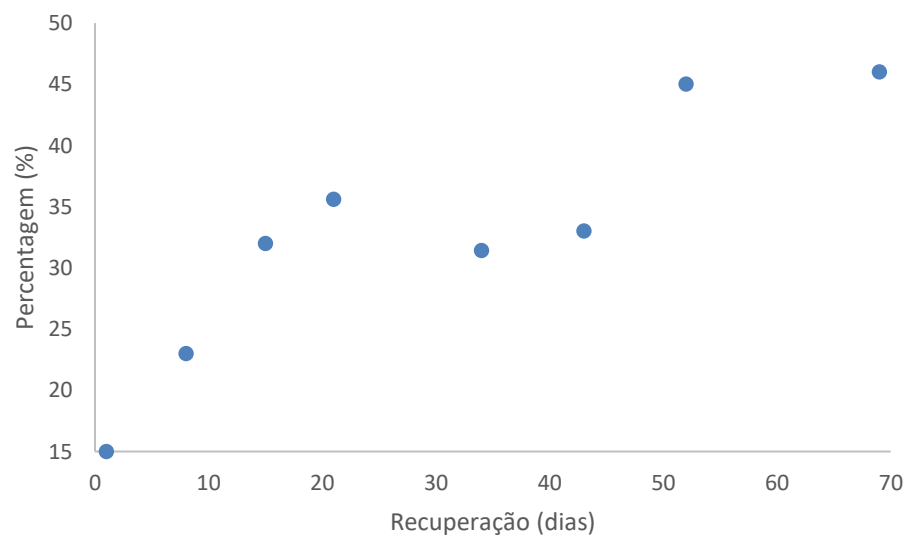


Figura 14 – Evolução do hematócrito (%), de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

As enzimas AST e ALT possuem atividades no fígado das aves, mas não são específicas deste órgão uma vez que também podem ser encontradas nos músculos esquelético e cardíaco, no cérebro e no rim (T. W. Campbell, 2012a; Samour et al., 2016).

Os valores das enzimas ALT e AST encontram-se normais com exceção dos valores obtidos 43 dias após entrada, em que ambas as enzimas se encontram aumentadas (Fig. 15). Como não são específicas de apenas um tecido não era possível concluir que existam danos em algum órgão como por exemplo no fígado ou músculo.

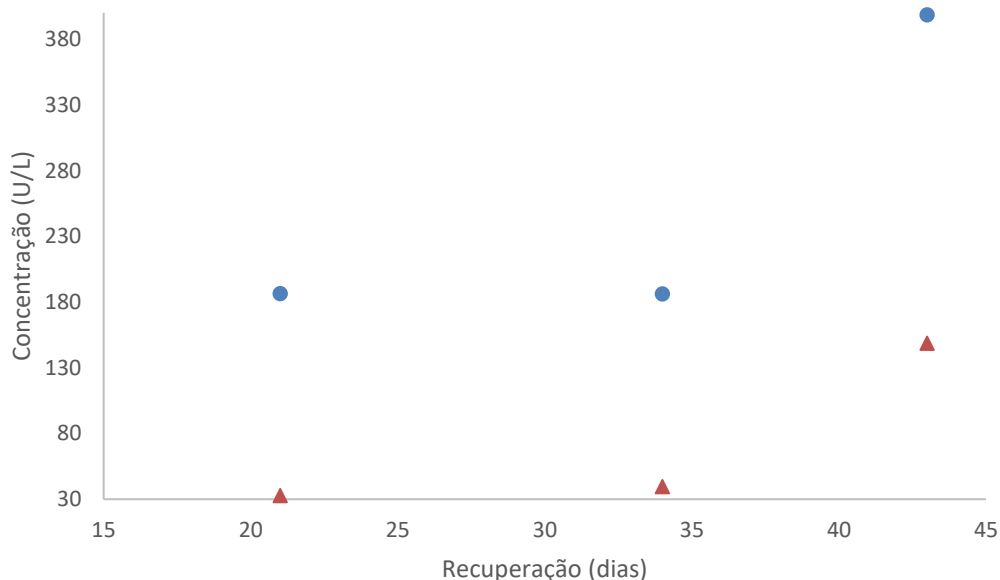


Figura 15 – Evolução da concentração (U/L) das enzimas ALT (triângulos vermelhos) e AST (pontos azuis) de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

Será necessário analisar conjuntamente com outras enzimas como por exemplo a CK, cuja atividade é específica do músculo. Porém, a amostra de plasma do dia 45 de recuperação encontrava-se hemolisada, o que pode ter influenciado este valor mais elevado, uma vez que a enzima ALT é afetada pela hemólise (Samour et al., 2016).

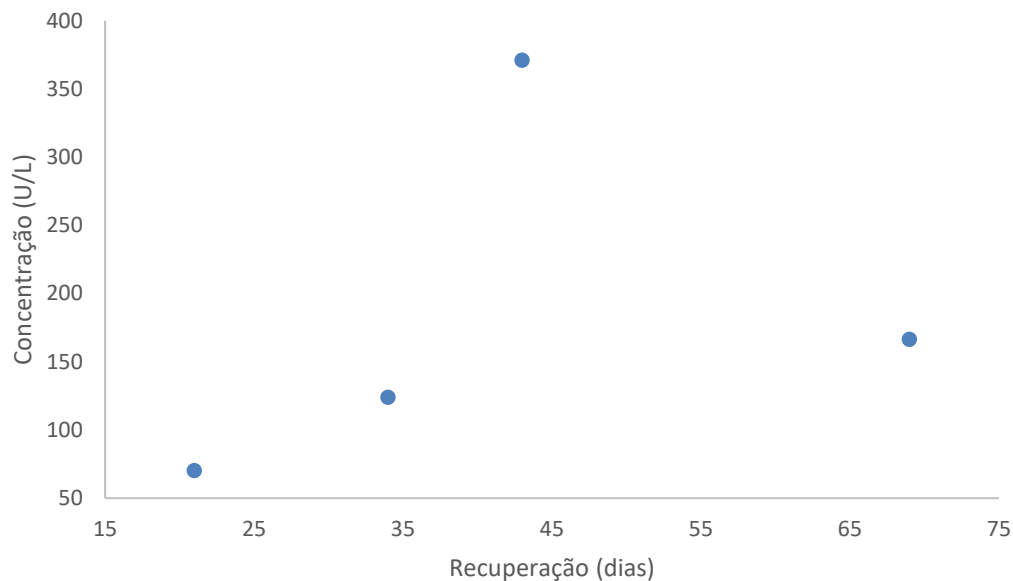


Figura 16 - Evolução da concentração (U/L) da enzima CK, de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

A enzima CK foi a que mais variou durante a recuperação (Fig. 16). Em aves, esta enzima é específica do músculo e por isso pode ser utilizada para diagnóstico de danos musculares (Bollinger et al., 1989; Businga et al., 2007).

Na Fig. 17 está descrita a evolução do colesterol. É possível verificar a tendência no aumento da concentração deste lípido ao longo do período de recuperação, bem como a elevação dos seus valores relativamente ao intervalo referenciado para aves saudáveis (100-250mg/dL) (Capitelli & Crosta, 2013), tal como já foi referido anteriormente. Este aumento na concentração de colesterol pode ser explicado pela existência de obstrução biliar extra-hepática, fibrose hepática, hiperplasia do ducto hepático, hipotireoidismo, dieta ricas em gordura e lipemia (T. W. Campbell, 2012a). No entanto, é necessário considerar que as colheitas de sangue foram realizadas sempre que era possível reunir todas as condições necessárias e nem sempre os animais se encontravam em jejum, fator que pode ter influenciado os valores de colesterol.

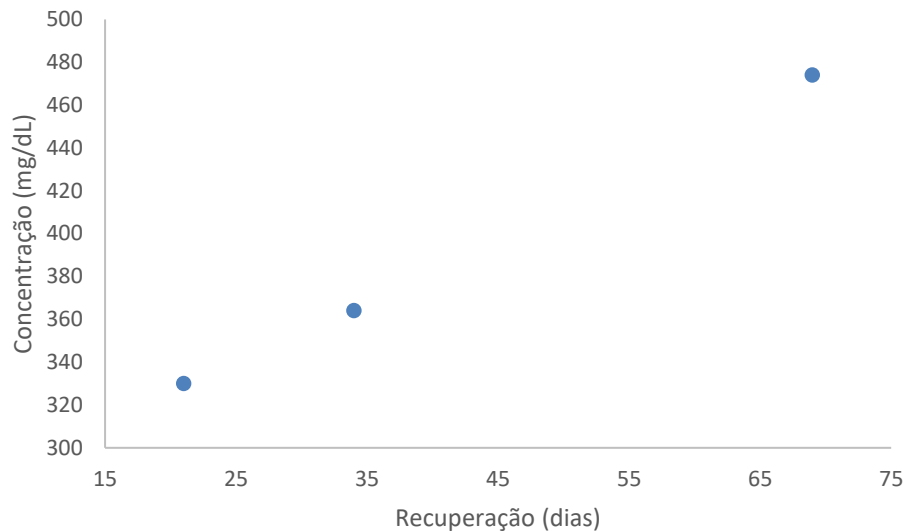


Figura 17 - Evolução da concentração (mg/dL) do colesterol total, de um indivíduo da espécie *F. glacialis*, em função do número de dias de recuperação.

Após 72 dias de reabilitação no CRAM, esta ave foi libertada e devolvida à natureza ao largo da Barra de Aveiro.

Apesar de todos os esforços para melhorar o bem-estar dos animais em reabilitação, a passagem pelo processo de recuperação será sempre geradora de alguma ansiedade para os animais admitidos. Por isso, análises ao sangue de animais nestas condições terão sempre de ser analisadas detalhadamente devido à existência de um fator no ambiente externo que as influenciará e certamente levará a algumas diferenças quando comparadas com análises ao sangue de animais saudáveis no seu meio ambiente natural.

CASO CLÍNICO 2

No dia 17 de junho de 2018 deu entrada no CRAM um indivíduo juvenil - 1º ano da espécie *M. bassanus*, encontrado em Peniche, sujeito a captura accidental por pesca desportiva.

Durante o exame físico realizado após a admissão do animal, verificou-se a existência de uma lesão e edema no tibiotarso direito de gravidade média. Para além disso, possuía peso abaixo do indicado e mostrava-se deprimido. Apresentava incapacidade de se sustentar e de voar.

Iniciou a toma de um suplemento vitamínico e mineral (Aquaminivit), Itraconazol como medida preventiva de aspergilose e um antibiótico de largo espectro (Amoxicilina/Ácido Clavulânico), com o objetivo de combater a infeção do ferimento presente no tibiotarso. Foi administrado também um anti-inflamatório (Meloxicam) e um antifúngico (Mycostatin).

A alimentação realizou-se de acordo com o protocolo de emaciação utilizado no centro, que inclui o fornecimento de papa de peixe. Depois passou gradualmente a comer peixe forçado.

Na primeira análise realizada ao sangue, verificou-se que a percentagem do hematócrito se encontrava baixa (26,2%) tal como a concentração de proteínas totais (2 mg/dL) (Fig. 18 e 19).

Através da Fig. 18 é possível observar o aumento gradual da concentração das proteínas totais que atingiram valores considerados normais para indivíduos saudáveis a partir do 12º dia após entrada no centro.

É visível a diferença existente entre as medições efetuadas pelo Mindray e as calculadas manualmente. Contudo, contrariamente ao que acontece no primeiro caso clínico, os valores das concentrações obtidas pelo Mindray são relativamente menores.

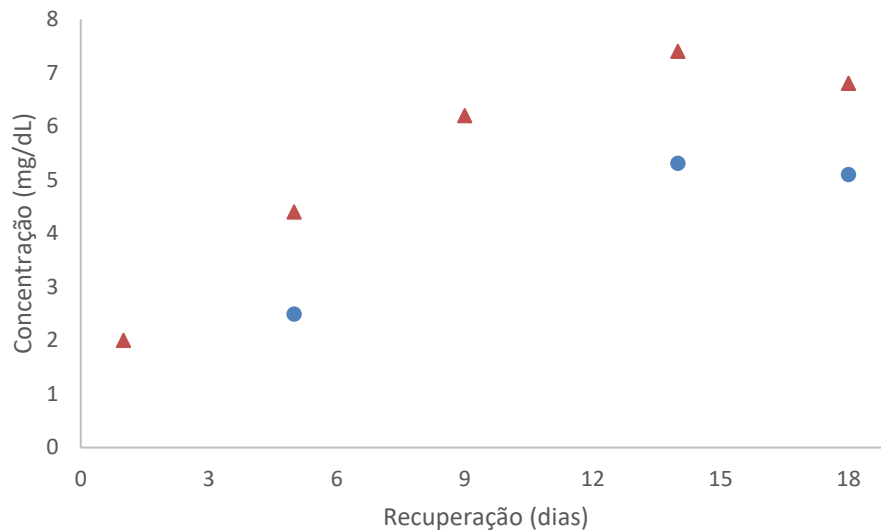


Figura 88 - Evolução da concentração das proteínas totais (mg/dL) de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação. Comparação entre dois métodos: Mindray (pontos azuis) e manual (triângulos vermelhos).

Apesar da diminuição inicial da percentagem ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue, ocorreu uma evidente melhoria deste parâmetro enquanto o animal se encontrou em reabilitação mesmo não tendo sido atingidos valores normais para um indivíduo saudável (Fig. 19).

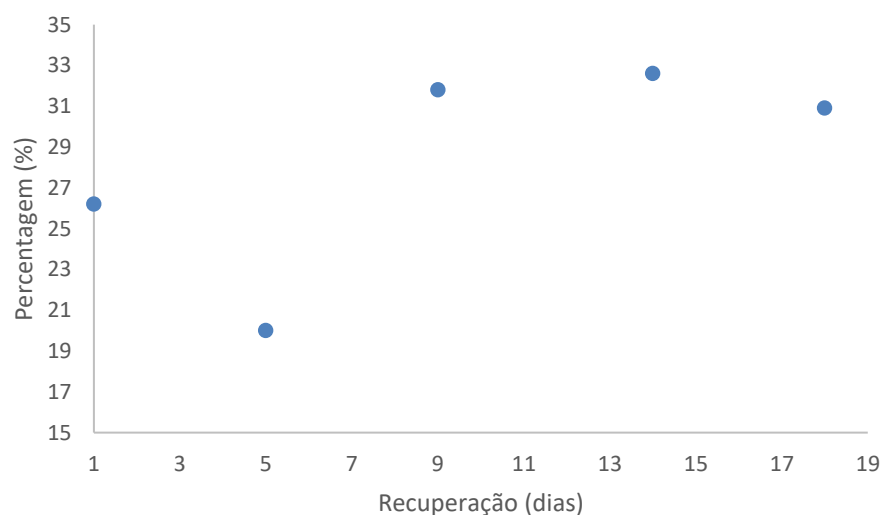


Figura 19 - Evolução do hematócrito (%), de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação.

A concentração da enzima AST mostrava-se bastante aumentada, atingindo apenas valores normais a partir do 14º dia de recuperação (Fig. 20). Segundo

Campbell (2012), considera-se que a atividade desta enzima é elevada quando as concentrações no plasma ultrapassam 275 U/L. Além disso, este autor salienta também que é necessária especial atenção a atividades superiores a 800 U/L.

A enzima ALT estava também com concentrações superiores ao verificado em indivíduos saudáveis (19-50 U/L) (T. W. Campbell, 2012a). Contudo, aproximadamente após 15 dias em reabilitação, atingiu atividades com valores considerados normais (Fig. 20).

Relativamente à enzima CK, as medições apresentaram atividades bastante elevadas (Fig. 20). Concentrações entre 100-500 U/L são consideradas normais na maioria das espécies de aves (T. W. Campbell, 2012a). Como já foi referido, as enzimas ALT e a AST não são específicas de nenhum tecido, mas conjuntamente com os valores da CK neste caso clínico, é possível diagnosticar danos no tecido muscular esquelético.

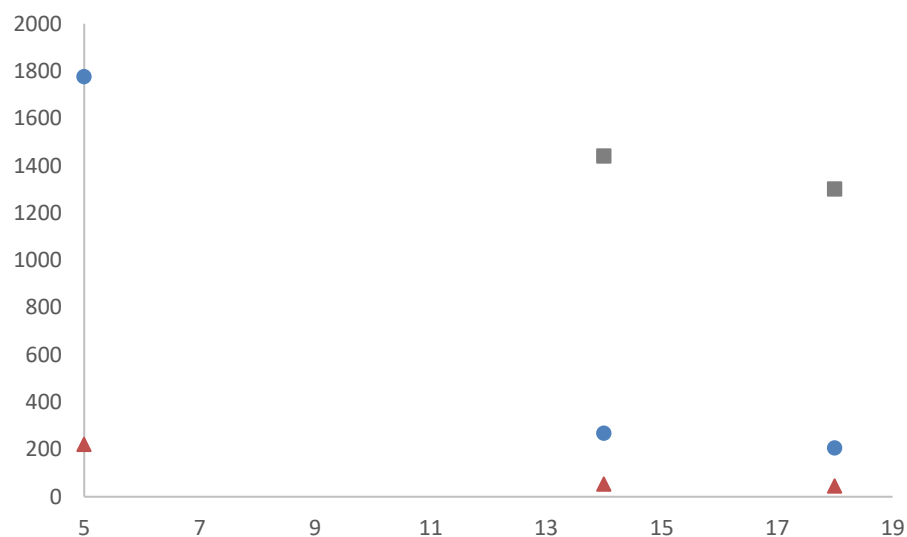


Figura 20 - Evolução da concentração (U/L) das enzimas ALT (triângulos vermelhos) e AST (pontos azuis) e CK (quadrados cinza), de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação.

A enzima LDH é composta por várias isoenzimas e por isso pode ser encontrada em quase todos os tecidos (T. W. Campbell, 2012a). Por este motivo não é possível analisar as suas concentrações separadamente de outras enzimas.

A atividade desta enzima no indivíduo em estudo, apesar de ter sofrido um declínio, permaneceu sempre dentro dos valores indicados para indivíduos saudáveis (Fig. 21).

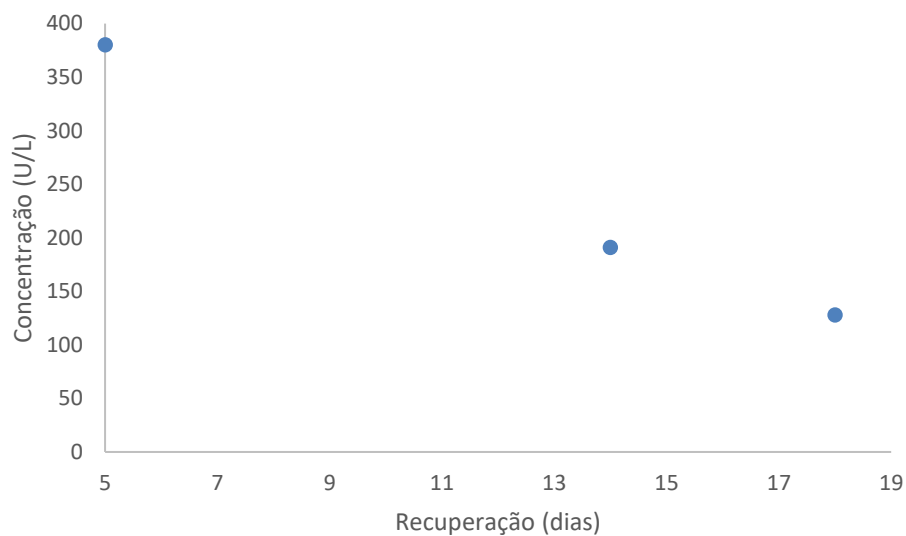


Figura 21 - Evolução da concentração (U/L) da enzima LDH, de um indivíduo da espécie *M. bassanus*, em função do número de dias de recuperação.

O facto da sua atividade aumentar e diminuir muito mais rapidamente do que as enzimas ALT e AST após a existência de algum dano hepático ou muscular, torna-a relevante na diferenciação entre estes dois tipos de danos (T. W. Campbell, 2012a). Posto isto, ao analisarmos simultaneamente as enzimas AST, ALT e CK, como já foi referido anteriormente, é possível confirmar os danos existentes a nível muscular.

Infelizmente, apesar de todos os esforços para que recuperasse, o animal continuou a apresentar muita dificuldade de locomoção e equilíbrio, sendo que o esforço que exercia sobre a lesão do tibiotarso não permitiu a sua melhoria. Como não adotava uma postura normal, apresentava também inícios de úlceras de pressão nas zonas plantares. Para além disso não mostrava aumento de apetite, não refletia comportamentos normais nem defensivos e deixou de ter impermeabilidade nas penas.

Perante estas circunstâncias, concluiu-se que o animal não detinha qualidade de vida nem qualquer possibilidade de vir a recuperar e por isso, após 42 dias em reabilitação nas instalações do CRAM, procedeu-se à sua eutanásia.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO

O aumento da pressão antropogénica, nos oceanos e na zona costeira, afeta negativamente as espécies que deste espaço dependem, principalmente as que já se encontram com estatuto ameaçado como é o caso da população da Cagarra em Portugal, considerada como vulnerável (Cabral et al., 2005).

Torna-se por isso importante, compreender quais os fatores que mais ameaçam estas populações, quais as principais consequências associadas (p.e: ferimentos e patologias) e qual o melhor tratamento a fornecer em cada caso, para que o sucesso de reabilitação seja o mais elevado possível.

Neste trabalho, o principal objetivo foi a avaliação hematológica e bioquímica do sangue enquanto os animais se encontravam em reabilitação nas instalações do CRAM. Nem sempre foi possível colher amostras à entrada de todos os animais. De facto, muitos dos animais encontravam-se bastante desidratados, sendo impossível recolher a quantidade de sangue necessária para, após a centrifugação, ainda se obter o volume de plasma necessário para ser exequível efetuar o estudo bioquímico.

Apesar de existirem poucos estudos relacionados com a análise do perfil bioquímico e hematológico de aves marinhas (a maior parte está relacionada com aves de companhia ou de produção (p.e Bowes et al., 1989; Capitelli & Crosta, 2013; Harr, 2002; Perozo et al., 2003; Schmidt et al., 2007), os que existem, recolheram amostras de sangue de aves aparentemente saudáveis no seu meio natural (p.e Alonso-Alvarez, 2005; Bollinger et al., 1989). Outros estudos correspondem a ensaios clínicos para comparar valores entre aves saudáveis e aves expostas a algum tipo de substância química (p.e. Newman et al., 1999, 2000).

É também ainda muito difícil realizar a comparação bioquímica e hematológica do sangue de aves, pelos motivos já referidos e porque existe muita variabilidade na parte laboratorial. Muitos valores bioquímicos de sangue das aves que são utilizados como valores de referência, utilizam soro em vez de plasma, ou então amostras de plasma que não foram centrifugadas imediatamente após a sua colheita. Para além disso, os parâmetros bioquímicos medidos no sangue variam de acordo com os ritmos circadianos e sazonais de cada espécie (Joseph & Meier, 1973; Lumeij & Westerhof, 1988).

Estes fatores podem levar a alterações na amostra, criando uma grande fonte de variabilidade. De facto, seria possível criar intervalos de referência relativos a uma determinada população de aves, que neste caso teria de ser alimentada por uma dieta conhecida, mantida numa localização geográfica num determinado período do ano (Hochleithner, 1994), mas para isso seriam necessários muitos mais estudos, com muitos aspetos éticos a considerar. Também por esta razão, é bastante importante que se registem os valores obtidos para os animais admitidos nos centros de recuperação para que se possam ir compilando um número cada vez maior e mais robusto de dados sobre várias espécies.

Como muitos dos estudos efetuados recolheram amostras de animais que se encontram na Natureza, ou então capturaram animais e posteriormente fizeram os seus estudos (p.e Alonso-Alvarez, Ferrer, & Velando, 2002; Doussang et al., 2015; Edwards, Mallory, & Forbes, 2006; Mallory et al., 2015) não podemos comparar esses resultados com os conseguidos no presente trabalho. De facto, o objetivo no Centro é melhorar o estado de saúde do animal e não a experimentação, e por isso, não pode haver um esquema de amostragem definido ou extremamente consistente. Neste trabalho, apenas foram recolhidas as amostras necessárias para permitirem o melhor diagnóstico possível dos animais, com o intuito principal de providenciar o tratamento mais adequado. Sempre que um animal, devido ao seu estado de saúde deteriorado pudesse indicar que haveriam consequências relativas à colheita, evitava-se esta amostragem, o que levou consequentemente ao número reduzido de amostras. Por este mesmo motivo, em várias das tabelas que apresentam os parâmetros medidos neste trabalho, apenas aparecem expressas os valores mínimos e máximos.

Como foram utilizados três métodos para avaliação do sangue das aves, ou seja, o método manual (que inclui medições de Pt no Refractómetro e medições manuais de Hct), o Mindray e o EPOC, achou-se interessante e relevante comparar as variáveis possíveis. Posto isto, verificou-se que, embora exista alguma variabilidade, para todas as espécies as concentrações de proteínas totais são consistentes entre os resultados obtidos no Mindray e no Refractómetro. O mesmo acontece para os valores de CREA e GLU medidos no Mindray e no EPOC. Por outro lado, considerando os valores obtidos para o Cálcio (medido no Mindray e EPOC) e

para o Hct (medido manualmente e no EPOC), observou-se uma diferença maior relativamente aos valores das médias. De facto, os valores de Cálcio apresentam-se consistentemente mais elevados quando medidos no Mindray e a percentagem de Hct apresenta-se mais elevada quando calculada manualmente. Porém não se consegue explicar a ocorrência desta variação.

No entanto, embora as concentrações de proteínas totais tenham sido consistentes entre os resultados obtidos no Mindray e no Refractómetro quando se realizou a comparação entre os dois métodos para as várias espécies, esta consistência não foi verificada durante a análise dos casos clínicos 1 e 2 (ver resultado). Tal como já foi referido, estas diferenças podem ser explicadas pela presença de fibrinogénio no plasma. Mesmo assim, a concentração de proteínas é bastante mais elevada quando comparamos a análise do Refractómetro com os valores obtidos no Mindray (método do biureto) (Lumeij, 2008). De facto, foi já demonstrado que a utilização do Refractómetro não é a mais indicada para a avaliação da concentração de proteínas no sangue de aves (Lumeij & de Bruijne, 1985) e, por outro lado, a presença de hemólise afeta a precisão deste equipamento (Harr, 2002).

O perfil dos leucócitos é alterado na presença de stress e pode estar diretamente relacionado com o nível das hormonas de stress (Garcia, Hermosa, & Aguirre, 2010). Por este motivo, a sua análise é bastante útil na avaliação do estado geral do indivíduo. Neste tipo de situações, é normal verificar um aumento na percentagem de heterófilos e uma diminuição na percentagem de linfócitos. Estas variações podem estar relacionadas com a libertação da hormona Corticosterona (Averbeck, 1992; Edwards et al., 2006). Neste trabalho, os resultados hematológicos para indivíduos da espécie *L. michahellis* mostram-se mais elevados para todos os tipos de leucócitos e causas de entrada, exceto para os linfócitos e basófilos cujas percentagens são menores (ver tabela 12 resultados), quando comparados com um estudo relativo à hematologia desta espécie (Garcia et al., 2010). Ainda não foi possível encontrar uma razão que explicasse a menor percentagem de linfócitos e basófilos.

De facto, a maioria dos estudos hematológicos de aves marinhas encontra-se relacionado com restrições ou alterações na alimentação e com a interação com

hidrocarbonetos (p.e. Alonso-Alvarez & Ferrer, 2001; Newman et al., 1999, 2000). Contudo, estes dados são passíveis de serem explicados, pela restrição do espaço e aumento do manuseamento das aves que, como consequência, pode elevar os seus níveis de stress aumentando também a percentagem de heterófilos (Garcia et al., 2010).

Como os estudos hematológicos e bioquímicos para estas espécies em reabilitação são quase nulos, associar o aumento ou diminuição de determinados parâmetros a cada tipo de causa de entrada é bastante difícil.

Contudo, verificou-se que na causa de entrada trauma, os níveis bioquímicos da Bil-D, CK e AST encontram-se aumentados e que a percentagem de Hct e concentração de ALT encontram-se diminuídas. A maioria das causas de trauma, referem-se a interações recorrentes com a arte de pesca desportiva, como capturas acidentais e emaranhamento em fios de “nylon”. Existem também casos de animais que dão entrada devido a fraturas ósseas. É de esperar que, após estas interações, os animais desenvolvam algum tipo de dano muscular.

A enzima CK é bastante específica como indicadora de perturbação muscular (Lumeij, 2008), mas o seu incremento também pode estar relacionado com neuropatias, deficiência em vitamina E e selénio, em casos de intoxicação por chumbo e ocasionalmente em casos de infeção pela bactérias do género *Chlamydia* (Hochleithner, 1994). Serve também como parâmetro de diagnóstico diferencial entre danos hepáticos e musculares nos casos em que a enzima AST se encontra igualmente elevada (T. W. Campbell, 2012a). Esta última enzima referida, a AST, também pode ser associada a alterações na função hepática (Lumeij, 2008).

Não é possível inferir relativamente aos parâmetros associados às outras duas causas de entrada analisadas tendo em conta o reduzido número de amostras compiladas de momento.

Os resultados das análises efetuadas para todos os indivíduos da espécie *L. michahellis*, obtidos no presente estudo, mostram consistência com um estudo anterior (Garcia et al., 2010) apesar de se ter em conta, que as condições de amostragem diferenciam bastante (Tabela 18).

Tabela 18 – Análises bioquímicas realizadas para a espécie *L. michahellis*.

Parâmetros (unidade)	Presente trabalho	Garcia et al., 2010
Globulina (g/dL)	1,96-5,36	-
Alb/Glo	0,1-0,88	-
UREA (mg/dL)	8,1-46	-
ALP (U/L)	45-176	24,75-150,71
TP (g/dL)	2,15-6,89	1,93-6,6
ALB (g/dL)	0,2-1,53	1,23-2,98
GGT (U/L)	2-22	-
AST (U/L)	115,2-1410,4	7,63-57,52
ALT (U/L)	30,8-218,8	5,71-40,40
CREA (mg/dL)	0,74-1,2	-
GLU (mg/dL)	282-492	106,31-359,46
P (mg/dL)	2,04-5,61	0,65-6
CK (U/L)	229,4-5021,8	30,25-321,91
CA (mg/dL)	7,2-12,2	6,33-9,9
UA (mg/dL)	3,2-18,8	0,58-16,63
MG (mg/dL)	2-3	0,85-4,79
LDH (U/L)	89,8-932,8	-
TC (mg/dL)	114-576	171,81-565,64
Bil-T (μmol/L)	58,87-409,94	-
Bil-D (μmol/L)	10-44	-

No CRAM, durante o ano de 2017, 40,8% dos animais que deram entrada foram devolvidos ao oceano (animais transferidos, animais que já deram entrada mortos ou então que morreram antes de dar entrada no CRAM, no transporte e na praia não foram contabilizados para esta percentagem). Devido ao nível de gravidade das causas de entrada dos animais admitidos no CRAM, a taxa de sucesso do CRAM não é tão elevada como a referida em Montesdeoca et al., (2017) para outro centro de recuperação, onde uma parte representativa das admissões refere-se a aves marinhas desorientadas por poluição luminosa. No entanto, a taxa de sucesso é significativa e enfatiza a importância do investimento neste tipo de trabalho, para que possam ser reabilitados mais animais de maneiras mais eficazes, eventualmente com implicações na conservação de algumas populações que possam apresentar problemas de estatuto e conservação.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível obter valores hematológicos e bioquímicos de amostras de sangue recolhidas durante o processo de reabilitação de alguns dos indivíduos admitidos no Centro de Reabilitação. Este estudo contribuiu para o aumento do conhecimento ao nível de análises sanguíneas em aves marinhas, grupo para o qual não existem quase nenhuns valores de referência. Este estudo comprovou também que a utilização do Refratómetro não é a mais indicada para a avaliação da concentração de proteínas no sangue de aves, um parâmetro de grande importância nas primeiras fases de decisão sobre o protocolo de tratamento a seleccionar no caso de aves marinhas.

Devido ao número elevado de variáveis neste estudo (ao nível do número de espécies, número e classe de idade dos indivíduos, métodos de análise utilizados, causas de entrada), os resultados obtidos, apesar de contribuírem para a melhoria dos diagnósticos identificados, representam uma contribuição para o que terá que ser um estudo mais alargado a continuar no futuro.

Finalmente, informações relativas a análises hematológicas e bioquímicas do sangue de aves em reabilitação são muito escassas e não permitem fazer comparações ou retirar conclusões robustas sobre os resultados deste trabalho. Assim, é de extrema importância a continuação da compilação deste tipo de dados para que o tratamento e sucesso na reabilitação possam evoluir.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelló, P., & Esteban, A. (2011). Trawling bycatch does affect Balearic Shearwaters *Puffinus mauretanicus*. *Fisheries Oceanography*, 20(4), 263–277.
- Alonso-Alvarez, C. (2005). Age-dependent changes in plasma biochemistry of yellow-legged gulls (*Larus cachinnans*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(4), 512–518.
- Alonso-Alvarez, C., & Ferrer, M. (2001). A biochemical study of fasting, subfeeding, and recovery processes in yellow-legged gulls. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(5), 703–713.
- Alonso-Alvarez, C., Ferrer, M., & Velando, A. (2002). The plasmatic index of body condition in Yellow-legged Gulls *Larus cachinnans*: A food-controlled experiment. *Ibis*, 147–149.
- Averbeck, C. (1992). Haematology and blood chemistry of healthy and clinically abnormal great black-backed gulls (*Larus Marinus*) and herring gulls (*Larus Argentatus*). *Avian Pathology*, 21(2), 215–223.
- Bellizzi, M., & Duerr, R. S. (2013). Northern Fulmar (*Fulmarus glacialis*) Rehabilitation During “Wrecks” in California. *IAAAM*.
- BirdLife International (2018) IUCN Red List for Birds
- Boettcher Gallardo, A. A. (2004). Valores bioquímicos sanguíneos del cisne de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*, Molina 1782), en una población silvestre, de Valdivia, Chile. *Universidade Austral de Chile*.
- Bollinger, T., Wobeser, G., Clark, R. G., Nieman, D. J., & Smith, J. R. (1989). Concentration Of Creatine Kinase And Aspartate Aminotransferase In The Blood Of Wild Mallards Following Capture By Three Methods For Banding. *Journal of Wildlife Diseases*, 25(2), 225–231.
- Bowes, V. A., Julian, R. J., & Stirtzinger, T. (1989). Comparison of serum biochemical profiles of male broilers with female broilers and White Leghorn chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53(1), 7–11.
- Bush, B. M. (1991). Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. *Blackwell Scientific Publications Ltd*.
- Businga, N. K., Langenberg, J., & Carlson, L. (2007). Successful Treatment of Capture Myopathy in Three Wild Greater Sandhill Cranes (*Grus Canadensis* Tabida). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 21(4), 294–298.
- Butchart, S. H. M., Stattersfield, A. J., Bennun, L. A., Shutes, S. M., Akçakaya, H. R., Baillie, J. E. M., Stuart, S. N., Hilton-Taylor, C., Mace, G. M. (2004). Measuring Global Trends in the Status of Biodiversity: Red List Indices for Birds. *PLoS Biology*, 2(12).
- Cabral, M. J., Almeida, J., Dellinger, T., Almeida, N. F. de, Oliveira, M. E., Palmeirim, J.

- M., Queiroz, A. I., Rogalo, L., Santos-Reis, M. (2005). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Instituto Da Conservação e Da Natureza.
- Campbell, T. (1994). Hematology. In *Avian medicine: principles and application* (pp. 176–198).
- Campbell, T. W. (2012a). Clinical Chemistry of Birds. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2th ed., pp. 582–598).
- Campbell, T. W. (2012b). Hematology of Birds. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2th ed., pp. 238–276).
- Campbell, T. W. (2015). Hematologic Techniques in Lower Vertebrates. In *Exotic Animal Hematology and Cytology* (4th ed., pp. 199–205).
- Capitelli, R., & Crosta, L. (2013). Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16(1), 71–120.
- Catry, P., Gerales, P. L., Pio, J. P., Almeida, A. (2010). Aves marinhas da Selvagem Pequena e do Ilhéu de Fora: censos e notas, com destaque para a dieta da Gaivota-de-patas-amarelas. *Airo*, 29–35.
- Chaloupka, M., Work, T. M., Balazs, G. H., Murakawa, S. K. K., & Morris, R. (2008). Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003). *Marine Biology*, 154(5), 887–898.
- Clark, P., Boardman, W., & Raidal, S. (2009). *Atlas of Clinical Avian Hematology*.
- Dein, F. J. (1983). Avian hematology: erythrocytes and anemia. In *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet* (pp. 10–23).
- Diamond, J. M., Karasov, W. H., Phan, D., & Carpenter, F. L. (1986). Digestive physiology is a determinant of foraging bout frequency in hummingbirds. *Nature*, 320(6057), 62–63.
- Dmitrieva, L., Kondakov, A. A., Oleynikov, E., Kydyrmanov, A., Karamendin, K., Kasimbekov, Y., Baimukanov, M., Wilson, S., Goodman, S. J. (2013). Assessment of Caspian Seal By-Catch in an Illegal Fishery Using an Interview-Based Approach. *PLoS ONE*, 8(6).
- Doussang, D., Merino, V., Moreno, L., Islas, A., Barrientos, C., Mathieu, C., Cerda, F., López, J., Ortega, R., González-Acuña, D. (2015). Hematologic And Biochemical Parameters Of Kelp Gulls (*Larus Dominicanus*) Captured In The City Of Talcahuano, Chile. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(3), 447–455.
- Edwards, D. B., Mallory, M. L., & Forbes, M. R. (2006). Variation in baseline haematology of Northern Fulmars (*Fulmarus glacialis*) in the Canadian High Arctic. *Comparative Clinical Pathology*, 14, 206–209.
- Fowler, M. E. (1986). *Zoo and Wild Animal Medicine* (2th ed.).
- Garcia, M., Hermosa, Y., & Aguirre, J. (2010). Does breeding status influence

- haematology and blood biochemistry of yellow-legged gulls? *Acta Biologica Hungarica*, 61(4), 391–400.
- Gerlach, C. (1979). Differentialblutbild und Plasmaenzymuntersuchungen bei Greifvögeln im Verlaufe eines Jahres (Mai 1977 bis Mai 1978). *Der Praktische Tierarzt*, 60, 673–674.
- Goldsworthy, S. D., & Page, B. (2007). A risk-assessment approach to evaluating the significance of seal bycatch in two Australian fisheries. *Biological Conservation*, 139, 269–285.
- Greiner, E. C., & Ritchie, B. W. (1994). Parasites. *Avian Medicine: Principles and Application*, 1007–1029.
- Harr, K. E. (2002). Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. *Veterinary Clinical Pathology*, 31(3), 140–151.
- Harrison, G. J., & Harrison, L. R. (1986). *Clinical avian medicine and surgery: including aviculture*.
- Hawkey, C., Samour, J. H., Ashton, D. G., Hart, M. G., Cindery, R. N., Ffinch, J. M., & Jones, D. M. (1983). Normal and clinical haematology of captive cranes (gruiformes). *Avian Pathology*, 12(1), 73–84.
- Hochleithner, M. (1994). Biochemistries. In *Avian medicine: principles and application* (pp. 223–227).
- IUCN 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2.
- Joseph, M. M., & Meier, A. H. (1973). Daily rhythms of plasma corticosterone in the common pigeon, *Columba livia*. *General and Comparative Endocrinology*, 20(2), 326–330.
- Karamanlidis, A., Androukaki, E., Adamantopoulou, S., Chatzistryrou, A., Johnson, W., Kotomatas, S., Papadopoulou A., Paravas, V., Pires, R., Tounta, E., Dendrinou, P. (2008). Assessing accidental entanglement as a threat to the Mediterranean monk seal *Monachus monachus*. *Endangered Species Research*, 5, 205–213.
- Lin, G. L., Himes, J. A., & Cornelius, C. E. (1974). Bilirubin and biliverdin excretion by the chicken. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 226(4), 881–885.
- Lind, G. W., Gronwall, R. R., & Cornelius, C. E. (1967). Bile pigments in the chicken. *Research in Veterinary Science*, 8(3), 280.
- Louzao, M., Arcos, J. M., Guijarro, B., Valls, M., & Oro, D. (2011). Seabird-trawling interactions: factors affecting species-specific to regional community utilisation of fisheries waste. *Fisheries Oceanography*, 20(4), 263–277.
- Lucas, A. M., & Jamroz, C. (1961). *Atlas of avian hematology*.
- Luís, A. R., Couchinho, M. N., & dos Santos, M. E. (2014). Changes in the acoustic behavior of resident bottlenose dolphins near operating vessels. *Marine Mammal Science*, 30(4), 1417–1426.
- Lumeij, J. T. (2008). Avian Clinical Biochemistry. In J. J. Kaneko, J. W. Harvey, & M. L.

- Bruss (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6th ed., pp. 839–872).
- Lumeij, J. T., & de Bruijne, J. J. (1985). Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. *Avian Pathology*, 14(3), 441–444.
- Lumeij, J. T., de Bruijne, J. J., & Kwant, M. M. (1990). Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. *Avian Pathology*, 19(2), 255–261.
- Lumeij, J. T., & Overduin, L. M. (1990). Plasma chemistry references values in psittaciformes. *Avian Pathology*, 19(2), 235–244.
- Lumeij, J. T., & Westerhof, I. (1987). Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. *Veterinary Quarterly*, 9(3), 255–261.
- Lumeij, J. T., & Westerhof, I. (1988). Clinical evaluation of thyroid function in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology*, 17(1), 63–70.
- Mallory, M. L., Little, C. M., Boyd, E. S., Ballard, J., Elliott, K. H., Gilchrist, H. G., Hipfner, J. M., Petersen, A., Shutler, D. (2015). Leucocyte profiles of Arctic marine birds: Correlates of migration and breeding phenology. *Conservation Physiology*, 3, 1–11.
- Marcos, R., & Santos, M. (2011). Técnicas de Colheita e Coloração de Esfregaços. In *Atlas de Citologia Veterinária* (pp. 1–27).
- Matias, R., & Catry, P. (2010). The diet of Atlantic Yellow-legged Gulls (*Larus michahellis atlantis*) at an oceanic seabird colony: estimating predatory impact upon breeding petrels. *European Journal of Wildlife Research*, 56(6), 861–869.
- Maxwell, M. H., & Burns, R. B. (1985). Blood eosinophilia in adult bantams naturally infected with *Trichostrongylus tenuis*. *Research in Veterinary Science*, 39(1), 122–123.
- McCain, S. (2012). Charadriiformes. In *Zoo and Wild Animal Medicine* (pp. 112–115).
- Meirinho, A., Barros, N., Oliveira, N., Catry, P., Lecoq, M., Paiva, V., Geraldes, P., Granadeiro, J. P., Ramírez, I., Andrade, J. (2014). *Atlas das Aves Marinhas de Portugal*. Lisboa: Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves.
- Mendes, P., Eira, C., Torres, J., Soares, A. M. V. M., Melo, P., & Vingada, J. (2008). Toxic Element Concentration in the Atlantic Gannet *Morus bassanus* (Pelecaniformes, Sulidae) in Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(3), 503–509.
- Mitchell, E. B., & Johns, J. (2008). Avian Hematology and Related Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 501–522.
- Montali, R. J. (1988). Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, 99(1), 1–26.
- Montesdeoca, N., Calabuig, P., Corbera, J. A., & Orós, J. (2017). A long-term

- retrospective study on rehabilitation of seabirds in Gran Canaria Island, Spain (2003-2013). *PLOS ONE*, 12(5).
- Moore, M., van der Hoop, J., Barco, S., Costidis, A., Gulland, F., Jepson, P., Moore, K., Raverty, S., McLellan, W. (2013). Criteria and case definitions for serious injury and death of pinnipeds and cetaceans caused by anthropogenic trauma. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103(3), 229–264.
- Munilla, I., Díez, C., & Velando, A. (2007). Are edge bird populations doomed to extinction? A retrospective analysis of the common guillemot collapse in Iberia. *Biological Conservation*, 137(3), 359–371.
- Neves, V. C., Murdoch, N., & Furness, R. W. (2006). Population Status and Diet of the Yellow-Legged Gull in the Azores. *Arquipélago. Life and Marine Sciences*, 23A, 59–73.
- Newman, S. H., Anderson, D. W., Ziccardi, M. H., Trupkiewicz, J. G., Tseng, F. S., Christopher, M. M., & Zinkl, J. G. (2000). An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated American coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. *Environmental Pollution*, 107(3), 295–304.
- Newman, S. H., Mazet, J. K., Ziccardi, M. H., Lieske, C. L., Fauquier, D. A., Gardner, I. A., Zinkl, J. G., Christopher, M. M. (1999). Haematological Changes and Anaemia Associated with Captivity and Petroleum Exposure in Seabirds. *Comparative Haematology International*, 9(2), 60–67.
- Nicolau, L., Marçalo, A., Ferreira, M., Sá, S., Vingada, J., & Eira, C. (2016). Ingestion of marine litter by loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in Portuguese continental waters. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1–2), 179–185.
- Ohsumi, S. (1975). Incidental Catch of Cetaceans with Salmon Gillnet. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32(7), 1229–1235.
- Oliveira, N., Henriques, A., Miodonski, J., Pereira, J., Marujo, D., Almeida, A., Barros, N., Andrade, J., Marçalo, A., Oliveira, I. B., Ferreira, M., Monteiro, S., Vingada, J., Ramírez, I. (2015). Seabird bycatch in Portuguese mainland coastal fisheries: An assessment through on-board observations and fishermen interviews. *Global Ecology and Conservation*, 3, 51–61.
- Paleczny, M., Hammill, E., Karpouzi, V., & Pauly, D. (2015). Population Trend of the World's Monitored Seabirds, 1950-2010. *PLOS ONE*, 10(6).
- Pendl, H. (2008). Möglichkeiten und Grenzen einer praxisnahen Hämatologie beim Vogel, (36), 368–380.
- Perozo, F., Ferrer, J., Alvarado, M., Rincón, H., Mavarez, Y., & Gil, M. (2003). Valores Hematológicos en Pollos de Engorde expuestos de Forma Continua a Bajas Dosis de Aflatoxina B1 en el Estado Zulia, Venezuela, XIII, 59–64.
- Ramírez, I., Geraldés, P., Meirinho, A., Amorim, P., & Paiva, V. (2008). *Áreas Importantes para as Aves Marinhas em Portugal. Projecto LIFE04NAT/PT/000213 - Sociedade Portuguesa Para o Estudo das Aves*. Lisboa.

- Ramos, R., Ramírez, F., Sanpera, C., Jover, L., & Ruiz, X. (2009). Diet of Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*) chicks along the Spanish Western Mediterranean coast: the relevance of refuse dumps. *Journal of Ornithology*, 150(1), 265–272.
- S. T. Chou. (1972). Relative Importance of Liver and Kidney in Synthesis of Uric Acid in Chickens. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 50, 936–939.
- Samour, J., Silvanose, C., Pendl, H., Bailey, T. A., Beaufrère, H., Wernick., Bernadette, M., Schuster, R. K., Silvanos, C., Naldo, J., Sage, M., Arca-Ruibal, B., Krautwald-Junghanns, M. E., Pees, M., Schoemaker, N. J. Y. R. van Z. (2016). Clinical and Laboratory Diagnostic Examination. In *Avian Medicine* (pp. 73–178).
- Schmidt, E. M. S., Locatelli-Dittrich, R., Santin, E., & Paulillo, A. C. (2007). Patologia Clínica Em Aves De Produção – Uma Ferramenta Para Monitorar A Sanidade Avícola – Revisão. *Archives of Veterinary Science*, 12(3), 9–20.
- Schwemmer, P., & Garthe, S. (2005). At-sea distribution and behaviour of a surface-feeding seabird, the lesser black-backed gull *Larus fuscus*, and its association with different prey. *Marine Ecology Progress Series*, 285, 245–258.
- Svensson, L., Mullarney, K., & Zetterstrom, D. (2012). *Guia de Aves* (2th ed.).
- Teixeira, A. M. (1983). Seabirds breeding at the Berlengas, forty-two years after Lockley's visit. *International Journal of Avian Science*, 125, 417–420.
- Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., Denicola, D., Fettman, M., Lassen, E. D., Rebar, A., Weiser, G. (2004). Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. *United State of America* 77.
- Tietz, N. W., Huang, W. Y., Rauh, D. F., & Shuey, D. F. (1986). Laboratory tests in the differential diagnosis of hyperamylasemia. *Clinical Chemistry*, 32(2), 301–307.
- Viñuela, J., Ferrer, M., & Recio, F. (1991). Age-related variations in plasma levels of alkaline phosphatase, calcium and inorganic phosphorus in chicks of two species of raptors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 99(1–2), 49–54.
- Wight, P. A. L., Dewar, W. A., & Mackenzie, G. M. (1980). Monocytosis in experimental zinc deficiency of domestic birds. *Avian Pathology*, 9(1), 61–66.
- Woerpel, R. W., & Rosskopf, W. J. (1984). Clinical Experience with Avian Laboratory Diagnostics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14(2), 249–286.
- Work, T. M., Massey, J. G., Johnson, L., Dougill, S., & Banko, P. C. (1999). Survival and physiologic response of Common Amakihi and Japanese White-eyes during simulated translocation. *Condor*, 21–27.
- Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*, 80(3), 1107–1213.